



Université de Sherbrooke

**Détection améliorée du *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) et de  
l'entérocoque résistant à la vancomycine (ERV)**

Par

**Evelyne Benoît**

Département de Microbiologie et Infectiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M. Sc.) en Microbiologie et Infectiologie

Sherbrooke, Québec, Canada

Avril 2017

Membres du jury d'évaluation

Eric H. Frost, Ph. D.,	Microbiologie et Infectiologie	Directeur de recherche
Alfredo Menendez, Ph. D.	Microbiologie et Infectiologie	Membre du jury interne
Nancy Dumais, Ph. D.	Biologie	Membre du jury externe

© Evelyne Benoît, 2017

*À Kevin, René et Kinou, pour votre soutien et vos encouragements!*

*« La connaissance s'acquiert par l'expérience, tout le reste n'est que de l'information ».*  
*Albert Einstein, 1879-1955*

*« Ne craignez pas la perfection, vous ne l'atteindrez jamais »*  
*Salvador Dali, 1904-1989*

## RÉSUMÉ

### **Détection améliorée du *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) et de l'entérocoque résistant à la vancomycine (ERV).**

Par

Evelyne Benoît

Département de Microbiologie et Infectiologie, avril 2017

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de Maître ès sciences (M.Sc.) en Microbiologie et Infectiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Le SARM et l'ERV sont deux bactéries responsables d'infections nosocomiales importantes. Elles sont retrouvées au sein des différents centres hospitaliers à travers le monde et leur présence cause de grands problèmes en santé publique. Elles constituent notamment une cause majeure de complication des soins de santé avec, en conséquence, une augmentation de la mortalité et de la morbidité, une prolongation de l'hospitalisation et une hausse importante des coûts de santé (INSPQ). La détection rapide du SARM et de l'ERV permettrait un meilleur contrôle de ces maladies nosocomiales. Présentement, le dépistage se fait séparément. Afin de réduire le temps d'exécution des analyses, nous proposons de combiner le dépistage des 2 microorganismes.

Le projet consistait au développement d'une méthode d'analyse diagnostique pour la détection simultanée du SARM et de l'ERV par PCR. Par la suite, nous avons procédé à la validation de la méthode sur 99 spécimens de patients.

La réalisation de ce projet de recherche se scinde en trois étapes importantes : 1) l'élaboration d'un nouveau bouillon de culture permettant la croissance du SARM et de l'ERV, 2) la mise au point de la PCR en temps réel et finalement, 3) la validation de cette méthode grâce à un nombre significatif de spécimens de patients. Nous avons trouvé qu'un nouveau bouillon de culture, contenant 25 g/L de NaCl, d'aztréonam et de céfotaxime permettait la croissance concomitante du SARM et de l'ERV tout en inhibant la croissance du SARM et des entérobactéries. Notre PCR multiplex permet l'amplification du SARM traditionnel et SARM-AC, de la souche récemment découverte en Europe ainsi que les 2 principaux génotypes d'ERV. Nous avons validé ces deux innovations auprès de 99 participants. Analysées par la méthode de référence, la sensibilité et la spécificité de notre bouillon sont de 50% et de 95% respectivement pour le SARM. Analysée par notre PCR multiplex, la sensibilité augmente à 92,8%. La sensibilité et la spécificité de notre bouillon avec notre PCR multiplex ERV sont de 100%.

La validation du nouveau bouillon (1D) a démontré qu'il est aussi efficace voire plus que le bouillon utilisé actuellement. La nouvelle PCR permet l'amplification du SARM et de l'ERV simultanément dans un même programme PCR.

Mots clés : Bouillons d'enrichissement, infections nosocomiales, PCR, SARM, ERV

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	V
TABLE DES MATIÈRES .....	VI
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	10
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	11
INTRODUCTION .....	12
1.1 Introduction générale .....	12
Bactéries cocci à Gram positifs .....	13
1.1.1 Généralités .....	13
1.2.2 Le peptidoglycane.....	14
1.2.3 La synthèse de la paroi.....	16
1.3 Staphylococcus aureus .....	18
1.3.1 Les facteurs de virulence .....	19
1.3.2 La famille des pénicillines .....	20
1.3.2.1 Le mode d'action des pénicillines .....	22
1.3.2.2 Le mécanisme de résistance aux pénicillines .....	23
1.3.3 Les gènes de résistance du SARM.....	23
1.3.3.1 Casette staphylococcique mec .....	24
1.3.3.2 Souches SARM acquis en communauté .....	26
1.3.3.2 Nouvelle souche SARM .....	28
1.3.4 Diagnostic de SARM.....	28
1.3.4.1 Diagnostic différentiel de S. aureus .....	28
1.3.4.2 Méthodes de détection rapide du SARM.....	29
1.3.4.3 Dépistage par géloses chromogéniques .....	30
1.4 Les entérocoques.....	31
1.4.1 Les entérocoques résistants à la vancomycine.....	31
1.4.1.1 Le mode d'action de la vancomycine .....	32
1.4.1.2 Les mécanismes de résistance à la vancomycine.....	33
1.4.1.3 Résistances aux antibiotiques .....	35
1.4.2 Diagnostic de l'entérocoque .....	36
1.4.2.1 Diagnostic différentiel de E. faecium et faecalis .....	36
1.4.2.2 Dépistage par géloses chromogéniques .....	37
1.5 Méthodes de détection par PCR en temps réel .....	37
1.5.1 Quantification et semi-quantification .....	37
1.5.2 Réaction PCR.....	39
1.5.3 Courbes de dénaturation .....	40
1.6 Recensement des écrits .....	43
1.6.1 Méthode de détection actuelle .....	43
1.6.1.1 Dépistage par PCR : les méthodes commerciales.....	43
1.6.1.2 Dépistage par PCR : méthodes utilisées en recherche.....	44
1.6.1.3 Méthode de référence utilisée au CHUS.....	44
1.6.2 Revue de la littérature .....	48
1.6.3 Épidémiologie des SARM et des ERV .....	51
PROBLÉMATIQUE & OBJECTIFS.....	52

2.1	Problématique .....	52
2.2	Objectifs .....	53
	Objectif 1 : élaboration d'un bouillon d'enrichissement pour le SARM et l'ERV .....	53
	Objectif 2 : élaboration d'une PCR en multiplexe en temps réel .....	53
	Objectif 3 : validation du bouillon d'enrichissement .....	53
	Objectif 4 : validation de la PCR en multiplexe en temps réel .....	54
	Objectif 4a : Validation de la nouvelle PCR multiplexe .....	54
	Objectif 4b : Adaptation de la PCR sur le LC480 de Roche Diagnostics .....	54
	MATÉRIELS & MÉTHODES .....	55
3.1	Optimisation du bouillon de culture d'enrichissement .....	55
3.1.1	Méthode de production in vitro des spécimens .....	56
3.1.2	Préparation du bouillon d'enrichissement .....	57
	Composition du bouillon d'enrichissement sans antibiotique (bouillon neutre) ..	57
	Composition des bouillons avec antibiotiques .....	57
3.2	Détection par PCR .....	62
3.2.1	Extraction et PCR de référence .....	62
3.2.1.1	Méthode d'extraction de l'ADN .....	62
3.2.1.2	Méthode PCR de référence (Frost et Deslandes) .....	62
3.2.2	Élaboration de la PCR multiplexe en temps réel .....	65
3.2.1	Détection du SARM et de l'ERV par méthode PCR .....	70
3.2.1.2	Évaluation des oligonucléotides sélectionnés .....	70
3.3	Validation du bouillon d'enrichissement .....	70
3.3.1	Population à l'étude et échantillon .....	73
3.3.2	Échantillonnage .....	73
3.3.3	Critères d'inclusion et d'exclusion .....	74
3.3.4	Recrutement des sujets et prélèvements des échantillons .....	74
3.3.4	Variables et collecte des données .....	76
3.3.5	Déroulement de l'étude .....	76
3.3.6	Méthode de collecte des données .....	78
3.3.7	Considérations éthiques .....	78
3.3.8	Résultats de la validation des bouillons .....	79
3.4	Validation de la PCR en temps réel .....	79
3.4.1	Validation de la PCR multiplexe en temps réel .....	79
	RÉSULTATS .....	81
4.1	Mise au point d'un bouillon d'enrichissement pour SARM et ERV .....	81
4.1.1	Concentration bactérienne à utiliser lors des essais .....	81
4.1.2	Essais sur les bouillons d'enrichissement .....	82
4.2	Mise au point de la PCR en temps réel .....	91
4.3	Résultats de la validation du bouillon d'enrichissement .....	94
4.3	Exemples de courbes PCR multiplexe nuc/mecA .....	104
4.4	Analyses statistiques .....	109
	DISCUSSION .....	116
5.1	Rappel des objectifs du projet .....	116
5.2	Optimisation du bouillon d'enrichissement .....	116
5.3	Optimisation de la PCR multiplexe .....	119
5.4	Validation du bouillon d'enrichissement .....	120
5.5	Validation de la PCR .....	121

5.6 Comparaison des méthodes .....	121
5.7 Biais .....	125
5.8 Conclusions.....	126
5.9 Perspectives .....	126
REMERCIEMENTS.....	128
LISTE DES RÉFÉRENCES .....	129
ANNEXES I.....	136
VALIDATION DE LA PCR CLINIQUE SUR LE LC480 DE ROCHE DIAGNOSTICS .....	136
Validation de la PCR clinique sur le LC480 de Roche Diagnostics.....	137
Matériels & Méthodes .....	137
Résultats.....	140
Conclusion .....	141
ANNEXE II .....	142
FORMULAIRE D'INFORMATION ET DE CONSENTEMENT À LA RECHERCHE (CSSS RY) .....	142
ANNEXE III.....	149
CERTIFICATS D'APPROBATION FINALE CÉR .....	149



## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique de la structure du peptidoglycane.....	15
Figure 2 : Synthèse et clivage du peptidoglycane.....	17
Figure 3 : Proportion d'ordonnances aux EU pour les antibiotiques 2004-2014.....	22
Figure 4 : Structure moléculaire de la méticilline.....	21
Figure 5 : Structure moléculaire de la oxacilline.....	21
Figure 6 : Comparaison des cassette <i>SCCmec</i> .....	24
Figure 7 : Synthèse du peptidoglycane et mécanismes d'action de la vancomycine.....	32
Figure 8 : Structure moléculaire de la vancomycine .....	33
Figure 9 : Représentation de l'opéron <i>vanA</i> .....	35
Figure 10 : Représentation schématique des courbes de dénaturation .....	43
Figure 11 : Représentation schématique du site des amorces .....	44
Figure 12 : Dépistage du SARM au laboratoire clinique.....	47
Figure 13 : Dépistage de l'ERV au laboratoire clinique.....	48
Figure 14 : Synthèse pour la conception des amorces et des sondes.....	73
Figure 15 : CP avec la sonde nuc patient numéro 145.....	105
Figure 16 : CP avec la sonde mecAC patient numéro 145.....	106
Figure 17 : TM avec la sonde nuc patient numéro 145.....	107
Figure 18 : TM avec la sonde mecAC patient numéro 145.....	108
Figure 19 : CP avec la sonde <i>vanA</i> patient numéro 5.....	109
Figure 20 : Schéma stratégie d'amplification des trousses commerciales.....	123

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Types de cassettes staphylococciques répertoriés .....	25
Tableau 2 : Caractéristiques des gènes de résistances <i>van</i> . .....	34
Liste des solutions et des milieux .....	55
Tableau 3 : Distribution des dilutions bactériennes et concentrations antibiotiques.....	59
Tableau 4 : Exemples de dilutions déposées sur géloses pour le décompte bactérien .....	59
Tableau 5 : Distribution des bactéries selon les conditions .....	61
Tableau 6 : Liste des amorces utilisées.....	63
Tableau 7 : Liste des amorces utilisées lors du projet pour le <i>S. aureus</i> .....	67
Tableau 8 : Liste des amorces utilisées lors du projet pour les Entérocoques.....	68
Tableau 9 : Liste des sondes utilisées lors du projet (SARM et ERV).....	69
Tableau 10 : Liste des oligonucléotides synthétiques utilisés lors du projet .....	69
Tableau 11 : Liste des amorces et sondes utilisées dans la validation PCR .....	80
Tableau 12 : Détermination de la concentration bactérienne.....	82
Tableau 13 : Évaluation de la concentration bactérienne dans les bouillons.....	83
Tableau 14 : Synthèse des résultats obtenus lors de la reprise du premier essai .....	85
Tableau 15 : Résultats par PCR des bouillons avec les amorces SARM .....	86
Tableau 16 : Calculs statistiques des valeurs de CP pour la détection du SARM.....	88
Tableau 17 : Résultats par PCR des bouillons avec les amorces ERV .....	89
Tableau 18 : Calculs statistiques des valeurs de CP pour la détection de l'ERV .....	90
Tableau 19 : Alignement des séquences du gène <i>mecC</i> avec les séquences du gène <i>mecA</i> .....	91
Tableau 20 : Résultats PCR multiplexe .....	93
Tableau 21 : Description de la cohorte .....	95
Tableau 22 : Résultats de la validation des bouillons d'enrichissement.....	96
Tableau 23 : Résultats d'analyse PCR : Sondes et amorces PCR multiplexe .....	100
Tableau 24 : Valeurs de CP des colonies isolées avec la sonde nuc .....	104
Tableau 25 : Valeurs de CP des colonies isolées avec la sonde <i>mecAC</i> .....	105
Tableau 26 : Valeurs de TM des colonies isolées avec la sonde nuc .....	106
Tableau 27 : Valeurs de TM des colonies isolées avec la sonde <i>mecAC</i> .....	107
Tableau 28 : Valeurs de CP des colonies isolées avec la sonde <i>vanA</i> .....	108
Tableau 29 : Tableau de contingence .....	109
Tableau 30 : Évaluation des résultats : PCR-ERV .....	110
Tableau 31 : Tableau de contingence: PCR-ERV .....	111
Tableau 32 : Valeurs statistiques des résultats PCR-ERV.....	111
Tableau 33 : Évaluation des résultats SARM : Détection par PCR-Amorces cliniques.....	112
Tableau 34 : Tableau de contingence des résultats PCR-Amorces cliniques .....	112
Tableau 35 : Calculs valeurs statistiques des résultats PCR-Amorces clinique .....	113
Tableau 36 : Évaluation des résultats SARM : Détection par PCR- Multiplexe .....	113
Tableau 37 : Tableau de contingence: SARM : Détection par PCR- Multiplexe.....	114
Tableau 38 : Valeurs statistiques des résultats SARM : Détection par PCR-Multiplexe...	114

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Aztréonam: monobactam de la famille des $\beta$ -lactames
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (par le NCBI)
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CHUS	Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke
CSSS RY	Centre de santé et de services sociaux Richelieu-Yamaska
CSSS-IUGS	Centre de santé et de services sociaux Institut universitaire de gériatrie de Sherbrooke
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i> (anciennement NCCLS)
CTX	Céfotaxime : Céphalosporine de 3 <sup>e</sup> génération
D.O.	Densité optique
EDTA	Acide éthylène-diamine-tetraacétique
ERV	<i>Entérocoque</i> résistant à la vancomycine
ESV	<i>Entérocoque</i> sensible à la vancomycine
INSPQ	Institut national de santé publique du Québec
kDa	Kilodaltons
LPS	Lipopolysaccharides
LSPQ	Laboratoire de santé publique du Québec (INSPQ)
<i>mecA</i>	Gène de résistance à la mêtécilline
<i>mecC</i>	Gène de résistance à la mêtécilline provenant de la cassette XI
<i>nuc</i>	Gène de la thermonucléase du <i>S. aureus</i>
ND	Non disponible
NCBI	<i>The National Center for Biotechnology Information</i>
NCCLS	<i>The National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
PVL	<i>Penton-Valentine Leukocidin</i> : toxine produite par <i>S. aureus</i>
PCR	<i>Real-time polymerase chain reaction</i> .
SARM	<i>S. aureus</i> résistant à la mêtécilline ( <i>MRSA</i> )
SARM-AC	<i>S. aureus</i> résistant à la mêtécilline acquis en communauté ( <i>CA-MRSA</i> )
SASM	<i>S. aureus</i> sensible à la mêtécilline
SCC <i>mec</i>	Cassette chromogénique staphylococcique du gène <i>mecA</i> (ou <i>mecC</i> )
TSB	<i>Tryptone Soya Broth</i>
TZP	Tazocin (ou Pipéracilline avec Tazobactam) : famille des $\beta$ -lactames
UFC/mL	Unités formant des colonies par mL

## INTRODUCTION

### 1.1 Introduction générale

Un individu est en permanence porteur de microorganismes. Selon le microorganisme ou selon le cas, la colonisation microbienne va soit avoir un effet protecteur soit pas d'effets du tout envers l'individu, on parle alors de bactéries commensales. Cependant, si au contraire le microorganisme infecte l'individu, celui-ci développera une infection. Les milieux hospitaliers mettent en présence des individus sains et un grand nombre de patients présentant des pathologies variées, infectieuses ou non. Malheureusement, ces milieux sont d'excellents endroits pour acquérir de nouvelles infections. Il est possible de retrouver des germes sur le matériel médical, sur les poignées de porte, les surfaces des meubles, etc. Les sources potentielles d'infections entourent les bénéficiaires des soins de santé. Ayant un système immunitaire souvent affaibli, les patients sont des proies faciles pour ces microorganismes et acquièrent des infections dites « nosocomiales ». Selon l'état de santé du bénéficiaire, celui-ci peut être simplement colonisé, donc porteur de la bactérie, par exemple, ou devenir malade s'il est infecté par la bactérie.

Parmi les agents contractés à l'hôpital, les pathogènes les plus souvent isolés sont *S. aureus* (19,5%), *E. coli* (18,1%), *Staphylococcus à coagulums négatifs* (14,5 %) et *Klebsiella sp.* (9,3 %) (INSPQ). On retrouve également le *Clostridium difficile*, le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM), et les entérocoques résistant à la vancomycine (ERV) pour ne citer que ceux-ci. Le nombre d'infections nosocomiales acquises à l'hôpital croît malheureusement de manière constante et inquiète les autorités sanitaires (INSPQ).

De plus, il est important de regarder l'aspect financier. Les répercussions sur le budget des centres hospitaliers sont énormes. Selon les informations recueillies par l'INSPQ, dans sa publication datant de juin 2016, les coûts générés par un patient colonisé sont estimés à 1 360\$ par séjour.

Lorsqu'il s'agit d'une infection au SARM, le coût s'élève à 14 360\$ avec une prolongation de la durée d'hospitalisation à 14 jours. Une bactériémie ferait accroître les frais à 28 000\$ et finalement les coûts tripleraient lorsque le patient contracte une infection à SARM lors d'une intervention chirurgicale. (Kim *et. al.*, 2001) Concernant les dépenses supplémentaires reliées au SARM ou à l'ERV dans notre établissement, aucune étude n'a été faite à ce jour. Le service de prévention et contrôle des infections (PCI) du CHUS n'est pas en mesure de nous fournir les informations.

Nous avons donc jugé important de nous concentrer sur le dépistage de certains de ces agents afin d'influer sur la dissémination des germes responsables de certaines de ces infections.

Dans ce présent mémoire seul le SARM et l'ERV, acteurs importants des infections nosocomiales seront étudiées.

## **Bactéries cocci à Gram positifs**

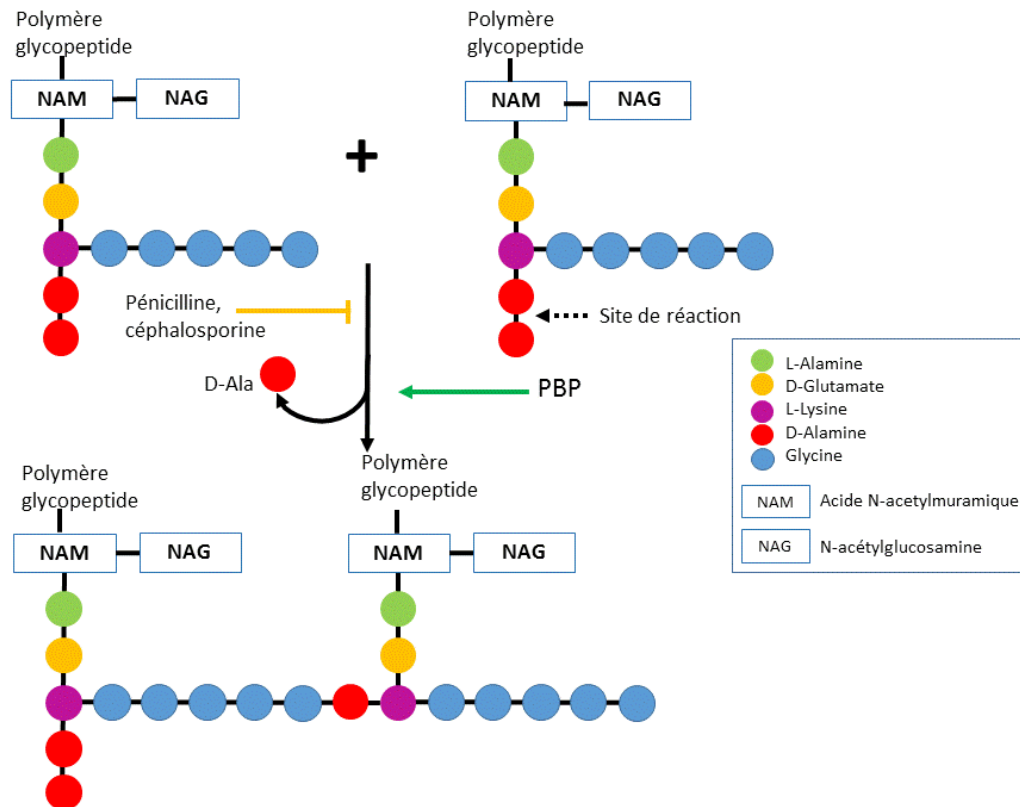
### ***1.1.1 Généralités***

Le test le plus fondamental dans l'identification des bactéries est la coloration du Gram. Cette information sera pertinente à la préparation de l'échantillon au moment de l'extraction de l'ADN de notre spécimen. Les bactéries à Gram positifs (Gram +) sont nommées ainsi grâce à la coloration de Gram, mise au point par Hans Christian Gram en 1884 (Tortora *et al.*, 2003). Elle leur confère une couleur bleu-mauve au microscope grâce à une coloration au violet de cristal. La coloration de Gram sert principalement à la classification des bactéries. Parmi les bactéries à Gram +, on retrouve nos bactéries d'intérêts soit le genre *Staphylococcus* et le genre *Enterococcus*. Les deux genres sont présents sous forme de coque (cocci). Le premier genre se dispose en forme de grappe alors que le second se retrouve sous forme de chaînette.

### 1.2.2 *Le peptidoglycane*

Les bactéries étudiées dans le cadre de ce mémoire possèdent une paroi composée d'une épaisse couche de peptidoglycane. Celui-ci est un assemblage complexe de polysaccharides et de protéines sous forme de feuillets qui entourent la membrane cytoplasmique des bactéries (Chapot-Chartier et Kulakauskas, 2014). La très grande majorité des bactéries possèdent cet assemblage au niveau de leur paroi cellulaire, cependant, les bactéries appartenant au genre *Mycoplasma* sont caractérisées par l'absence de paroi (Tortora *et al.*, 2003; Cabeen et Jacobs-Wagner, 2005). Le peptidoglycane confère aux bactéries leurs formes et les protège également de la déshydratation due aux changements osmotiques du milieu environnant (Chapot-Chartier et Kulakauskas, 2014; Cabeen et Jacobs-Wagner, 2005 et Typas *et al.*, 2011). Cette structure est essentielle à la survie de la bactérie, ce qui en fait une cible de choix pour l'antibiothérapie. La paroi bactérienne chez les Gram + est plus épaisse que celle retrouvée chez les bactéries Gram – (Tortora *et al.*, 2003). Cette différence aura également une importance lors de l'extraction de l'ADN de la bactérie. Le SARM et l'ERV possèdent une paroi épaisse due à la présence du peptidoglycane. De par ce fait, la bactérie qui possède une épaisse paroi sera plus résistante aux solutions d'extraction. (Les méthodes d'extraction seront détaillées ultérieurement).

Brièvement, le peptidoglycane est composé d'une alternance de deux monosaccharides, N-acétylglucosamine (NAG) et l'acide N-acétyl-muraminique (NAM) liés par un lien osidique  $\beta$  (1→4) (Figure : 1). Les chaînes de 10 à 65 sucres sont reliées entre elles par des ponts peptidiques composés de 4 acides aminés : L-Alanine, D-Glutamique, L-Lysine et D-Alanine (Chapot-Chartier et Kulakauskas, 2014). Les chaînes de disaccharides retrouvées chez *S. aureus* sont généralement de l'ordre de 3 à 10 sucres avec un maximum entre 23 et 26 sucres (Scheffers et Pinho, 2005).



**Figure 1 : Représentation schématique de la structure du peptidoglycane.**

Représentation de la synthèse du peptidoglycane chez *S. aureus*. Alternance de l'acide N-acetylmuramique (NAM) et du N-acétylglucosamine (NAG). Liaison entre le NAM et la chaîne d'acides aminés (Chapot-Chartier et Kulakauskas, 2014; Perry, *et al.*, 2002). Reproduction inspirée et autorisée par *Medicinal library*.

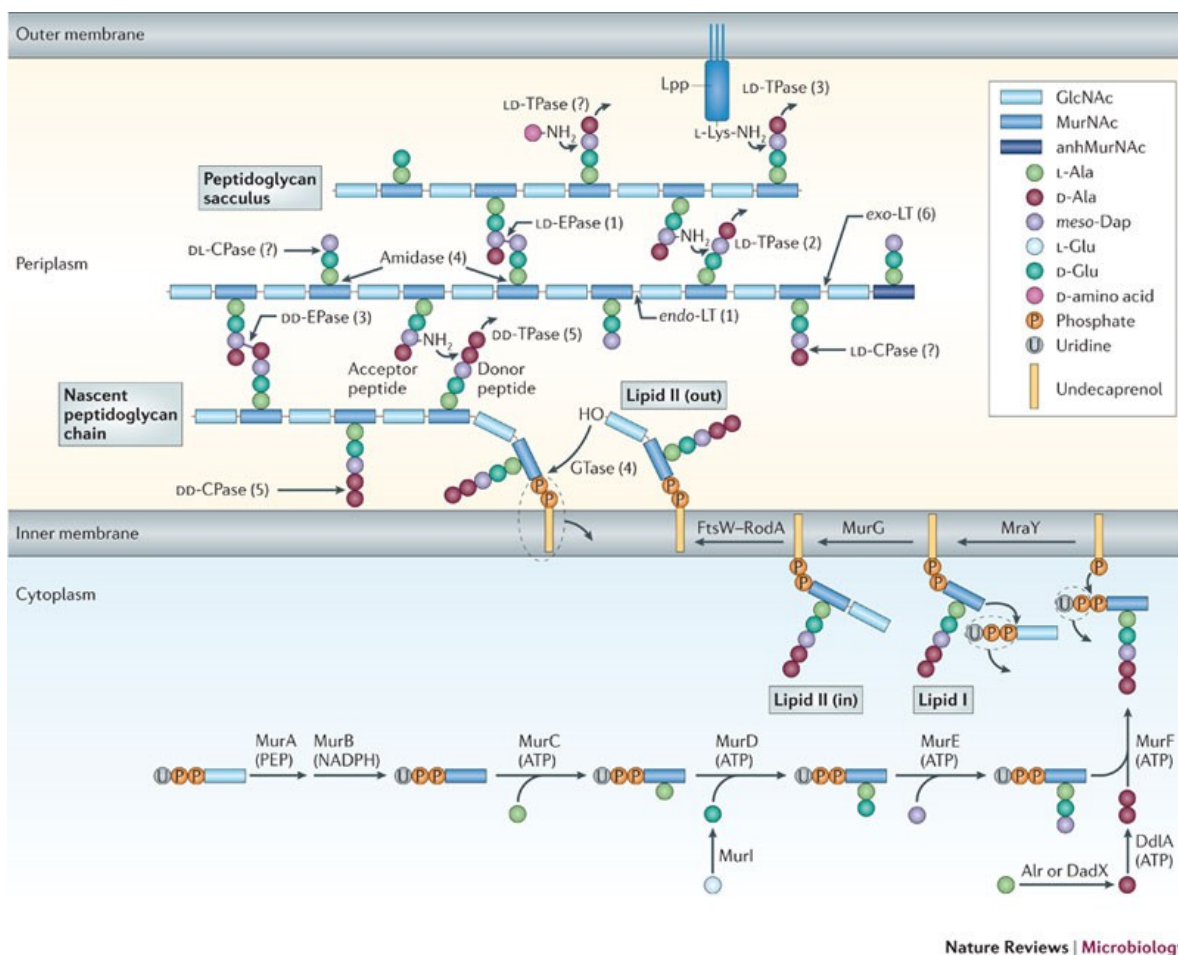
### 1.2.3 La synthèse de la paroi

Il y a trois étapes majeures dans la synthèse du peptidoglycane qui compose la paroi des bactéries. La première étape se situe dans le cytoplasme où il y a formation des précurseurs du peptidoglycane : les monomères UDP-N-acétylglycosamine et l'UDP-N-acétylmuramate-pentapeptide. Une suite de réactions catalysées par différents types d'enzymes (transférase, ligase, etc.) permet d'ajouter progressivement les acides aminés (L-Alanine, D-Glutamique, L-Lysine et le dimère D-Alanine/D-Alanine (Figure :1)) à l'UDP-N-acétylmuramate pour former le pentapeptide. (Figure :2) (Typas *et al.*, 2011; El Zoeiby *et al.*, 2003, Scheffers et Pinho, 2005). La seconde étape se déroule à la membrane cytoplasmique où les précurseurs du peptidoglycane sont transférés du cytoplasme à la membrane. Cette étape permet l'ancrage de la nouvelle molécule (le lipide I) à la membrane. Un UDP-N-acétylglucosamine est ensuite ajouté au lipide I pour former le lipide II (Figure :2) (Typas *et al.*, 2011).

Une fois que le lipide II est synthétisé, ce dernier se transfère du cytoplasme à la membrane interne afin qu'il soit à l'extérieur de la cellule. L'action de transfert du lipide II de part et d'autre de la membrane n'est actuellement pas complètement comprise par la communauté scientifique. Par exemple, certains proposent l'implication d'une flippase (Chapot-Chartier et Kulakauskas, 2014). Finalement, la troisième étape permet l'assemblage des précurseurs du peptidoglycane au reste de la paroi. Une glycosyltransférase (GTase) ajoute la nouvelle molécule (lipide II) à la chaîne préexistante du peptidoglycane. La synthèse du peptidoglycane requiert également de DD-transpeptidases (DD-TPases) nécessaire pour catalyser la formation des ponts peptidiques entre les feuillets du peptidoglycane. Les DD-TPases sont également nommées en anglais *Penicillin-binding-proteins* (PBPs), ou en français, les protéines liant la pénicilline (PLPs). Elles ont été nommées ainsi initialement grâce à leur capacité à faire des liens covalents avec la pénicilline. Elles sont notamment la cible des  $\beta$ -lactame, groupe d'antibiotique auquel appartient la pénicilline, la méticilline et à l'oxacilline (Typas *et al.*, 2011).

Le mécanisme de résistance du SARM est basé sur la capacité de la bactérie à modifier cette structure (PBP) ce qui empêche les pénicillines de se lier avec la protéine. Les mécanismes de résistance seront détaillés à la section 1.3.2.2.





Nature Reviews | Microbiology

### Figure 2 : Synthèse et clivage du peptidoglycane.

Le schéma décrit plus en détail la synthèse du peptidoglycane qui constitue une structure importante chez les bactéries Gram +. Au niveau du cytoplasme, nous retrouvons les molécules précurseurs à sa formation. La molécule (lipide II) est couplée à une flippase qui permet la permutation du lipide II à l'extérieur de la membrane interne. (Typas et al., 2011) (Figure autorisée par l'auteur).

Dans la prochaine section, nous définirons chacune des bactéries étudiées, les infections qu'elles causent, les toxines produites (*S. aureus*). Une brève description de l'antibiotique ciblant la bactérie au niveau de sa paroi sera abordée, le mécanisme de résistance de la bactérie contre l'antibiotique ainsi qu'un aperçu des tests diagnostiques pour le dépistage de la bactérie.

### 1.3 *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* est un pathogène dangereux causant une variété d'infections sévères. Il est l'une des premières causes de septicémies, d'infections des os, d'endocardites, de pneumonies (Popov *et al.*, 2014; Huletsky, *et al.*, 2004) d'empoisonnement alimentaire et du syndrome du choc toxique (Maeda *et al.*, 2016; King *et al.*, 2016). Ces infections sont particulièrement inquiétantes dans les populations hospitalisées et notamment chez les personnes âgées ou immunodéprimées (Skow *et al.*, 2005). Cette bactérie fait partie de la flore normale de la peau, on la retrouve notamment au niveau des narines, mais également au niveau de l'anus. Pour faire le dépistage de la bactérie, il est possible de faire un prélèvement nasal et/ou anal chez le patient afin de déterminer si ce dernier est porteur de la bactérie.

Cependant, depuis plus de 40 ans, *S. aureus* a acquis un nouveau facteur de virulence et certains isolats sont résistants à la méticilline (Chambers, 1997). (La méticilline et l'oxacilline sont des antibiotiques de la famille des pénicillines. Le sujet sera développé ultérieurement.) En effet, c'est au début des années 1960 que l'Europe vit sa première épidémie due à cette nouvelle souche qui s'est rapidement répandue dans le monde entier (Chambers, 1997, Jannati *et al.*, 2013). Le *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) est l'une des infections nosocomiales les plus importantes à ce jour (Hiramatsu, *et al.*, 2013).

### 1.3.1 Les facteurs de virulence

Le *S. aureus* possède une bonne capacité d'adaptation. Grâce aux pressions de l'environnement, particulièrement provenant du monde médical, la sélection naturelle favorise les souches plus virulentes et de plus en plus résistantes aux agents antimicrobiens. Parmi ces facteurs de virulence, les toxines jouent un rôle de premier plan (Otto, 2014). Plusieurs toxines produites par *S. aureus* créent des dommages aux membranes cellulaires conduisant à la mort de la cellule de l'hôte par le biais de toxines récepteur-dépendantes ou non-dépendantes (Otto, 2014). Elles peuvent interférer avec les récepteurs membranaires ou agir comme enzymes affectant les mécanismes de défense de l'hôte (Otto, 2014; Breshears *et al.*, 2016).

Les principales toxines produites par *S. aureus* ciblent les érythrocytes (les hémolysines) et les leucocytes (leucotoxines) (Otto, 2014). Plusieurs parmi celles-ci nécessitent une interaction avec un récepteur membranaire. Les  $\alpha$ -toxines, les plus connues à ce jour, forment des pores en forme de baril dans la cellule, changeant l'équilibre électrolytique, menant à la mort cellulaire (Otto, 2014). La *Panton Valentin Leukocidin* (PVL) est l'une des toxines retrouvées chez *S. aureus*, notamment chez le SARM-AC (ce sujet sera détaillé plus loin). Le gène de la PVL est davantage retrouvé chez les souches communautaires de SARM, les SARM-AC. Ces souches ont la capacité de produire une pneumonie létale nécrosante (Otto, 2014).

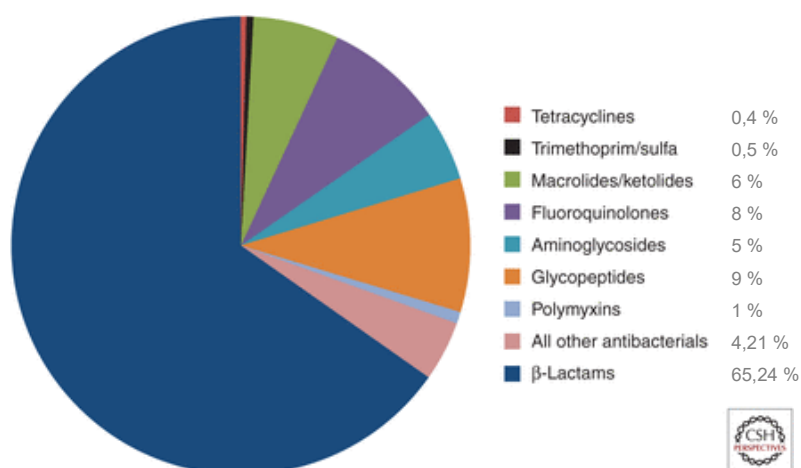
Cependant, les infections sévères sont habituellement associées aux toxines des super-antigènes (SAgT) produites par *S. aureus*. Parmi celles-ci figurent le *toxic shock syndrome toxin-1* (TSST-1) et les entérotoxines staphylococciques (SEs) (Otto, 2014; Breshears *et al.* 2016, Maeda *et al.*, 2016). La TSST-1 est notamment associée aux tampons hygiéniques qui ont causé une épidémie survenue dans les années 1980 (Clayton *et al.*, 1982).

On retrouve chez *S. aureus* plus de 20 souches sérologiques distinctes de super-antigènes et elles contribuent à la pathogenèse de la maladie par modulation de la réponse immunitaire de l'hôte (Wilson.G *et al.*, 2011). La toxine stimule la libération d'interleukine-1 (IL-1), d'IL-2, de facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ ) et d'autres cytokines (Wilson.G *et al.*, 2011).

### 1.3.2 *La famille des pénicillines*

La pénicilline est l'une des plus grandes découvertes dans le monde médical. Cet antibiotique permettait, entre autres, de traiter les infections causées par *S. aureus*. Découverte par Alexander Fleming en septembre 1928 (Harold C. Neu and Thomas D. Gootz. : Medical Microbiology. 4th edition 1996), la pénicilline a fait son apparition dans le monde hospitalier dans les années 40. Son introduction a révolutionné le monde de la médecine.

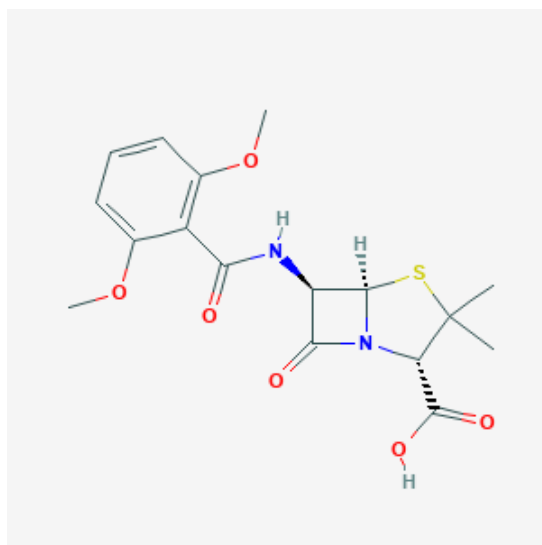
On retrouve parmi la famille des pénicillines différentes classes qui ont été synthétisées au fil du temps pour répondre aux mutations des bactéries. Les pénicillines font partie des bêta( $\beta$ )-lactames, tout comme les céphalosporines et les monobactames (Medical Microbiology. 4th edition 1996). Les  $\beta$ -lactames seront la classe d'antibiotiques la plus souvent utilisée pour traiter les infections bactériennes aux États-Unis en 2014-2016 (Figure : 3) (K. Bush et P. A. Bradford, 2016). Certaines classes des pénicillines sont employées davantage pour inhiber les bactéries à Gram + ou contre les bacilles à Gram - (Medical Microbiology, 4th edition 1996). La méticilline et l'oxacilline sont les membres de cette grande famille. Ces dernières sont de structures semblables, cependant, l'oxacilline est davantage utilisée dans le milieu clinique. (Figures : 4 et 5)



©2016 by Cold Spring Harbor Laboratory Press

**Figure 3 : Proportion d'ordonnances aux États-Unis pour les antibiotiques injectables par classe pour les années 2004-2014.**

Le pourcentage d'unités standard pour chaque antibiotique injectable prescrit aux États-Unis de 2004 à 2014:  $\beta$ -lactamines, 65,24 %. (Les données de la base de données IMS MDART trimestrielle sur fichier chez AstraZeneca.) (Bush, K. *et al.*, 2016) (Figure autorisée par l'auteur).



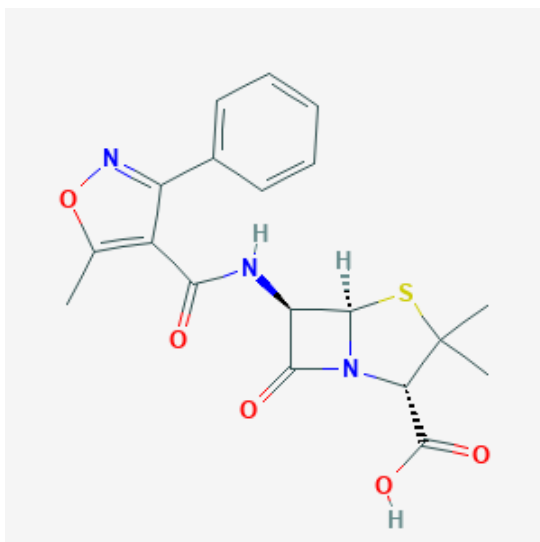
**Figure 4 : Structure moléculaire de la méticilline.**

Cycle  $\beta$ -lactame, au centre de la figure est une structure carrée composée de trois carbones avec un atome d'azote. Cette structure est commune à tous les antibiotiques de la famille des pénicillines.

Source: PubChem CID : 6087

URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

Description: Data deposited in or computed by PubChem (Image libre de droits d'auteur)



**Figure 5 : Structure moléculaire de l'oxacilline**

Source: PubChem CID : 6196

URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

Description: Data deposited in or computed by PubChem (Image libre de droits d'auteur)

#### 1.3.2.1 Le mode d'action des pénicillines

C'est grâce à ses caractéristiques structurales et moléculaires, notamment la présence d'un cycle  $\beta$ -lactame (Figures : 4 et 5) qui permet à la pénicilline de se lier, de façon covalente, au résidu sérine de la PBP (DD-transpeptidase) (Typas *et al.*, 2011). Il s'agit d'un inhibiteur compétitif du substrat présent dans la cellule qui permet l'élongation du peptidoglycane. En se liant ainsi, la pénicilline bloque la division de la bactérie, fragilise sa paroi et induit une lyse de la cellule (Typas *et al.*, 2011). La pénicilline agit comme agent bactéricide, car elle inhibe la croissance et la division cellulaire de la bactérie.

### 1.3.2.2 Le mécanisme de résistance aux pénicillines

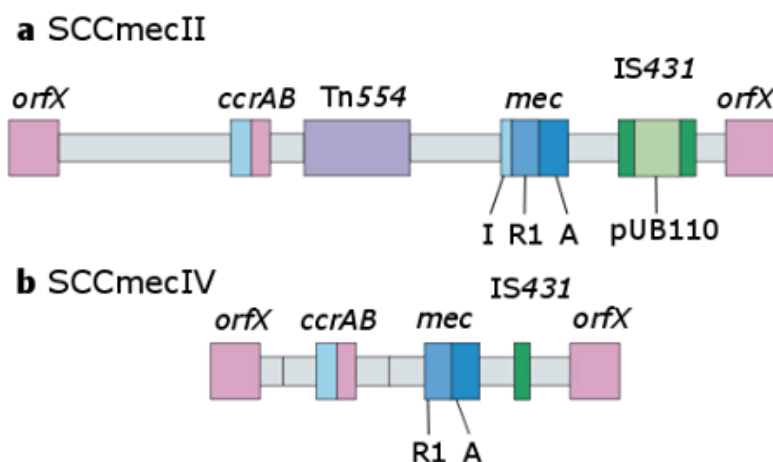
Bien que les pénicillines soient une famille d'antibiotiques de choix dans le traitement des infections, *S. aureus* a rapidement acquis la propriété de résister à la pénicilline, grâce, entre autres, à la pénicillinase. Il s'agit d'une enzyme de type  $\beta$ -lactamase qui hydrolyse le cycle  $\beta$ -lactame de l'antibiotique. (Figures : 4 et 5) Le gène de la pénicillinase se retrouve sur un plasmide (Turlej *et al.*, 2011). Le plasmide s'est étendu rapidement non seulement en centre hospitalier, mais également dans la communauté. On retrouve plusieurs types de  $\beta$ -lactamases en microbiologie. C'est une stratégie qu'emploient souvent les bactéries à Gram- pour résister aux antibiotiques. Cependant, les bactéries à Gram + possèdent aussi certaines  $\beta$ -lactamases (Medical Microbiology. 4th edition 1996). Tel que mentionné précédemment, les bactéries à Gram – ont une membrane lipidique externe. L'un des avantages d'avoir cette seconde membrane, c'est d'avoir la possibilité d'emmagasiner plus facilement les  $\beta$ -lactamases (Medical Microbiology. 4th edition 1996).

### 1.3.3 Les gènes de résistance du SARM

Dès lors, plusieurs molécules antibiotiques de la famille des pénicillines ont été créées afin de résister aux pénicillinases. Afin de contrer les infections causées par les bactéries produisant ces enzymes, une nouvelle pénicilline semi-synthétique (mécicilline) fut introduite en 1961 (Turlej *et al.*, 2011). L'oxacilline et la méticilline sont résistantes à la pénicillinase ( $\beta$ -lactamase). Cependant, *S. aureus* a acquis une nouvelle résistance qui lui permet de résister aux nouvelles molécules créées. Les gènes de résistance du SARM, contrairement aux  $\beta$ -lactamases qui clivent le cycle  $\beta$ -lactame, la transpeptidase adopte une nouvelle conformation et l'antibiotique ne peut plus s'y lier. Il y a encombrement stérique (Chambers, & DeLeo, 2009). C'est alors que *S. aureus* peut poursuivre la synthèse de la paroi cellulaire (Scheffers, D. J., & Pinho, M. G. 2005).

### 1.3.3.1 Casette staphylococcique *mec*

Le gène responsable de la résistance à la méticilline se nomme *mecA*. C'est un ADN chromosomal d'environ 30 à 50 kb. Lorsque la bactérie se retrouve dans un environnement où il y a de la méticilline ou de l'oxacilline, le gène inductible *mecA* est transcrit en PBP2a (ou PBP2') (Turlej *et al.*, 2011). Le gène *mecA* code pour une protéine de 76 kDa ayant une faible affinité pour les  $\beta$ -lactames (Chambers, 1997). Le gène est situé dans la cassette chromosomique staphylococcique (SCCmec) (Chambers, 1997). Le SCCmec est un élément génétique mobile découvert par Hiramatsu (Ito *et al.*, 2001) (Figure :6). Plusieurs types de SCCmec ont été décrits depuis 1980 (Chambers, 1997). Plus de onze types de SCCmec ont été décrits à ce jour, recensé par l'IWG-SCC (*International Working Group on the SCC elements*). (Tableau 1) Les staphylocoques à coagulums négatifs et *S. fleurettii* sont suggérés pour être le réservoir et l'origine du gène de résistance *mecA* (Hill-Cawthorne *et al.*, 2014).



**Figure 6 : Comparaison de la cassette de résistance du SARM nosocomial et de la souche acquise en communauté**

La SCCmec II est davantage retrouvée en milieu hospitalier contrairement à la cassette SCCmec IV qui se retrouve davantage en communauté. Dans cette figure, le complexe du gène *mec* comporte des certaines différences entre les souches nosocomiales et acquises notamment au niveau des gènes régulateurs *mecI* et *mecRI* associés aux *mecA* (Figure reproduite, avec autorisation de l'auteur Chambers, & DeLeo, 2009).



**Tableau 1 : Types de cassettes staphylococciques répertoriés**

TYPES DE SCCMEC	COMPLEXES DU GÈNE <i>CCR</i>	COMPLEXES DU GÈNE <i>MECA</i>	SOUCHES
<b>I</b>	1 (A1B1)	B	NCTC10442, COL
<b>II</b>	2 (A2B2)	A	N315, Mu50, Mu3, MRSA252, JH1, JH9
<b>III</b>	3 (A3B3)	A	85/2082
<b>IV</b>	2 (A2B2)	B	CA05, MW2, 8/6-3P, 81/108, 2314, cm11, JCSC4469, M03-68, E-MRSA-15, JCSC6668, JCSC6670
<b>V</b>	5 (C1)	C2	WIS(WBG8318), TSGH17, PM1,
<b>VI</b>	4 (A4B4)	B	HDE288
<b>VII</b>	5 (C1)	C1	JCSC6082
<b>VIII</b>	4 (A4B4)	A	C10682, BK20781
<b>IX</b>	1 (A1B1)	C2	JCSC6943
<b>X</b>	7 (A1B6)	C1	JCSC6945
<b>XI</b>	8 (A1B3)	E	LGA251

*International Working Group on the SCC elements* (Tableau reproduit libre de droits d'auteur)

Seules les souches de *S. aureus* possédant le gène *mecA* sont résistantes à l'oxacilline et la méticilline (Böcher *et al.*, 2010; Chambers, & DeLeo 2009). Cependant, un article est paru en 2014 décrivant la survenue d'une souche découverte au Royaume-Uni et qui aurait un phénotype sensible à la méticilline, mais un génotype de type *mecA* (Saeed *et al.*, 2014). Les auteurs ont récolté 500 souches où le phénotype de la souche a été identifié *S. aureus* sensible à la méticilline (SASM), 1,2% des souches ont été identifiées comme OS-MRSA (*Oxacillin susceptible methicillin resistant S. aureus*) et les auteurs ont retrouvé le gène *mecA*. Cependant, ils n'ont pas retrouvé les gènes *mecC* ou celui de la PVL, gènes retrouvés à l'occasion chez différentes souches de SARM (Voir section suivante).

Une étude de ces nouvelles souches serait à prévoir afin de connaître les raisons de cette sensibilité à l'oxacilline. Est-ce que la présence de l'antibiotique peut induire la transcription du gène ? Est-ce qu'une bactérie OS-MRSA mise en présence d'une bactérie MRSA (*mecA*, *mecC* et/ou avec la PVL) peut acquérir le gène manquant ? L'antibiothérapie du patient infecté par cette souche devrait prendre en considération la souche SARM.

### *1.3.3.2 Souches SARM acquis en communauté*

Rappelons que le SARM a fait son apparition au début des années 60 (Turlej *et al.*, 2011). Le terme SARM est employé pour désigner le *S. aureus* résistant à la méticilline possédant le gène *mecA*. Il s'agit habituellement de souches nosocomiales. Cependant, depuis les années 90, il est désormais possible de retrouver le SARM-AC, c'est-à-dire, des souches SARM acquises en communauté. Ces souches qui possèdent également le gène *mecA*, se retrouvent notamment au sein des équipes de sports de contact (football, escrime, lutte), en milieu carcéral, chez les enfants qui fréquentent les garderies, les homosexuels, les militaires, les itinérants de même que les utilisateurs de drogue intraveineuse (INSPQ; Millar *et al.*, 2007; Skova *et al.*, 2012). Cependant, il est possible aujourd'hui de retrouver ces souches SARM-AC en milieu hospitalier (Boyle-Vavra & Robert 2006).

Pour être considérée une infection comme étant à SARM-AC, le *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) établie lors de son programme de surveillance en 2000, les règles suivantes :

- Avoir une culture positive issue de n'importe quel site corporel dans les 48h suivant l'admission à l'hôpital.
- N'avoir aucun historique d'hospitalisation, de chirurgie ou ne pas avoir séjourné dans un établissement de soins de courte ou de longue durée dans la dernière année
- N'avoir aucun dispositif intérieur ou extérieur permanent (ex. cathéter ou stimulateur cardiaque).
- N'avoir jamais eu de culture positive à SARM (Skova *et al.*, 2012).

Contrairement aux souches SARM acquis en milieu hospitalier, les souches SARM-AC sont généralement classées avec les éléments de la cassette SCC-mec de type IV ou V (Mediavilla *et al.* 2012).

Les origines du SARM-AC proviennent de lignées différentes des SARM nosocomiales. Trois marqueurs génomiques majeurs distinguent ces deux SARM, leur lignée génétique, la structure de l'élément génétique du gène *mecA* et la présence du gène de la *Penton Valentin Leukocidine* (PVL) (Mediavilla *et al.* 2012).

En effet, contrairement aux souches nosocomiales, les souches SARM-AC peuvent posséder le gène de la PVL. Bien qu'il soit possible de retrouver ce gène chez les souches de *S. aureus* sensibles à la méticilline ou au SARM nosocomial (moins de 5%), ce-dernier est habituellement associé au SARM-AC (Mediavilla *et al.* 2012). Codé par les gènes *lukS-PV* et *lukF-PV* (PVL), la PVL cause des infections sévères notamment des endocardites, des pneumonies et des fasciites nécrosantes (Mediavilla *et al.* 2012; Skov *et al.* 2017). Les infections causées par le SARM-AC progressent rapidement et peuvent entraîner la mort (Boyle-Vavra *et al.* 2007). La fasciite nécrosante et la pneumonie nécrosante sont associées à un taux de mortalité de 20% et 75% respectivement (Skov *et al.* 2017). L'une de ces souches SARM-AC possédant le gène de la PVL est la souche USA300 (ST8-IV). Comme son nom l'indique, il s'agit d'une souche retrouvée principalement aux États-Unis et quelques endroits dans le monde, notamment au Canada (Skov *et al.* 2017; Mediavilla *et al.* 2012).

Habituellement les souches SARM-AC demeurent sensibles aux antibiotiques non- $\beta$ -lactames tel que la clindamycine, l'érythromycine et le triméthoprim-sulfaméthoxazole (Boyle-Vavra *et al.* 2006), aux macrolides, à la doxycycline ou minocycline en combinaison avec un  $\beta$ -lactame et finalement à la gentamycine (Kaplan *et al.* 2005). Cependant, la souche USA300 semble avoir acquise une résistance accrue à la mupirocine (Mediavilla *et al.* 2012; Kaplan *et al.* 2005). La sensibilité aux antibiotiques varie de l'origine géographique de la souche (Millar *et al.* 2017). Le fait que les souches SARM-AC soient sensibles à certains antibiotiques, permet de différencier ces-dernières d'un SARM nosocomial. Cependant, il est nécessaire de faire une confirmation par méthode moléculaire de façon plus exhaustive pour mieux définir la souche.

### 1.3.3.2 Nouvelle souche SARM

Puisque les bactéries sont en constant changement, il n'est donc pas impossible de découvrir la présence de nouvelles souches SARM. C'est ainsi qu'en 2012, une nouvelle souche SARM fit son apparition en milieu hospitalier. Cette dernière semblait résistante à l'oxacilline bien qu'elle ne fut pas détectée par les méthodes PCR commerciales (Garcia *et al.*, 2011; Paterson *et al.*, 2014; Pichon *et al.*, 2012). En procédant au séquençage de cette nouvelle souche, les chercheurs ont constaté plusieurs différences dans la séquence génétique entre les souches *mecA* et cette nouvelle souche. Les amorces et les sondes PCR retrouvées dans les trousses commerciales ne pouvaient s'hybrider sur la cible à cause de ces différences. Ce nouveau gène se nomme *mecC*. Jusqu'à présent, cette souche se retrouve sur le continent européen et au Royaume Unis (Garcia *et al.*, 2011; Paterson *et al.*, 2014; Pichon *et al.*, 2012). Cependant, cette découverte prend une importance capitale. Il importe d'en faire la détection afin d'éviter la propagation de cette nouvelle souche dans nos centres hospitaliers.

### 1.3.4 Diagnostic de SARM

À ce jour, plusieurs méthodes d'analyse sont possibles pour le diagnostic du SARM. Avant la venue des méthodes par PCR, les laboratoires d'analyses biomédicales utilisaient différentes méthodes biochimiques et antigéniques.

#### 1.3.4.1 Diagnostic différentiel de *S. aureus*

Pour l'identification du *S. aureus*, il est nécessaire de le différencier des autres *Staphylococcus* à coagulums négative (*coagulase-negative staphylococci* : CoNS). Il existe plusieurs méthodes pour la détection de la coagulase notamment la méthode en tube qui consiste à utiliser du plasma de lapin (sans calcium) avec une colonie de *S. aureus*. Le tube est incubé à 35°C pour une durée de 4h et 24h, l'apparition d'un caillot dans le tube après 4h ou 24h confirme la présence de l'enzyme chez la bactérie. Certaines souches de *S. aureus* requièrent plus de 4h pour la formation du caillot, c'est pourquoi le tube est réincubé à température pièce jusqu'à 24h au total. La détection de la coagulase en tube est le test standard de routine pour l'identification du *S. aureus* tel que décrit par le CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*), (Brown *et al.*, 2005).

Afin d'accélérer la recherche de l'enzyme, des versions commerciales d'agglutination au latex sont disponibles sur le marché. Ces tests détectent notamment la présence de la protéine A\* et/ou le facteur de coagulation. (\*Protéine de surface retrouvée dans la paroi du *S. aureus*. Elle est codée par le gène *spa* (Subrt *et al.*, 2011 ). Le gène *spa* est utilisé pour le typage moléculaire des différentes souches de *S. aureus* (Mediavilla *et al.*, 2012; Boyle-Vavra & Daum 2007). Ces trousses de détection ont cependant des difficultés pour dépister certaines souches de SARM qui produisent peu ou pas de facteur de coagulation et de protéine A (Kuusela *et al.*, 1994).

La confirmation de la résistance à la méticilline / oxacilline, le CLSI recommande un test de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des antibiotiques soit par la diffusion en disque ou par languette E-Test (Epsilométrie). Grâce à la méthode de Kirby-Bauer et la gélose Mueller-Hilton NaCl 2%, il est possible de déterminer la CMI de la bactérie. Cette méthode est standardisée avec une concentration d'une culture fraîche à 0,5 McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) et un disque de 6mg/L de céfoxitine. La gélose est incubée 24h à 35°C en O<sub>2</sub>. (National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCLS), 2000). Un diamètre de  $\geq$  à 22 mm indique une souche sensible à la méticilline. Cependant, un diamètre  $\leq$  à 21mm indique que la souche est résistante à la méticilline. Soit une CMI  $\geq$  16µg/ml pour l'oxacilline et une CMI  $\geq$  4µg/ml pour la méticilline (Hartman, & Tomasz, 1984; Katayama, *et al* 2000). Par la méthode Epsilométrique, la CMI correspond à la concentration exacte où l'ellipse croise la languette. Une souche est considérée sensible si elle est  $\leq$  à 2mg/L et elle est résistante si l'ellipse est  $\geq$  à 4mg/L.

Le dépistage du SARM peut également être réalisé par d'autres méthodes d'agglutination décrites par le CLSI, notamment une méthode au latex pour la détection du PBP2a ou par PCR (Brown *et al*, 2005).

#### 1.3.4.2 Méthodes de détection rapide du SARM

Auparavant, la sensibilité aux antibiotiques était la méthode de référence pour démontrer la présence du gène de résistance du SARM, bien que cette technique puisse s'avérer longue et coûteuse. Désormais sur le marché, plusieurs produits sont disponibles pour faire la détection rapide du SARM.

Les tests d'agglutination au latex prennent en moyenne 10 min et est basé sur la détection de la protéine PBP2a correspondant à la transpeptidase mutée par le gène *mecA* (Brown *et al.*, 2005). Ces tests sont sensibles et spécifique à *S. aureus* (van Griethuysen *et al.* 1999) mais les colonies doivent avoir poussées sur un milieu sans NaCl (Brown & Walpole 2001). De plus, puisqu'il s'agit d'un gène inductif, la production du PBP2a est induite par la présence de pénicilline contenue dans le milieu de croissance.

En plus des tests d'agglutination, nous retrouvons des tests phénotypiques utilisant un indicateur fluorescent sensible à l'oxygène (Trousse IDL-BBL® Crystal MRSA (Becton Dickinson Microbiology Systems, MD, É-U)). Il s'agit d'un bouillon contenant de l'oxacilline à 4µ/mL avec l'indicateur à oxygène. En se divisant, la bactérie résistante à l'oxacilline utilise l'oxygène présent dans le bouillon. Ainsi, en utilisant une lumière ultraviolette (Arbique *et al.*, 2001; Knapp *et al.*, 1994), l'indicateur devient fluorescent en absence d'oxygène dans le tube.

#### 1.3.4.3 Dépistage par géloses chromogéniques

Dernièrement, nous observons une augmentation de géloses chromogéniques sur le marché permettant l'identification rapide de divers microorganismes. Ces géloses sont sélectives et différentielles grâce à l'ajout d'antibiotiques qui inhibent les bactéries sensibles et de substrats chromogéniques qui colorent la colonie qui l'utilise pour croître (Malhotra-Kumar *et al.*, 2010). Pour la détection du SARM, nous retrouvons notamment sur le marché : Chrom ID MRSA de Biomérieux (Marcy l'Étoile, France ), MRSAselect de Bio-Rad (CA, É-U), BBL-CHROMagar MRSA de la compagnie BD (MD, É-U ) et de la compagne Oxoid (Nepean, ON, Canada ), la *Brilliance* MRSA agar. Les évaluations estiment leur sensibilité entre 81% et 83%, 90% pour la Brilliance d'Oxoid et de 87% à 99% pour la spécificité (Malhotra-Kumar *et al.*, 2010).

## 1.4 Les entérocoques

L'*Enterococcus faecium* et *E. faecalis* sont les deux principales espèces du genre entérocoque que l'on retrouve normalement dans les selles (Cetinkaya *et al.*, 2000). Les espèces suivantes font également parties du genre *Enterococcus*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. avium*, et *E. raffinosus* (Cetinkaya *et al.*, 2000). Cependant, *E. faecium*, et *E. faecalis* sont plus fréquemment isolés dans les spécimens patients (Louie *et al.*, 1992). À l'occasion, elles sont responsables d'infections au niveau du tractus urinaire, de bactériémies, d'endocardites et de méningites (Castillo-Rojas *et al.*, 2013; Louie *et al.*, 1992). Les ERV ont fait leur apparition au Québec vers la fin des années 90. Ce n'est qu'à partir de 2003 que les ERV sont inscrits sur la liste des maladies à déclaration obligatoire (MADO). Le terme ERV est réservé uniquement au *E. faecium* et *E. faecalis*. Bien que l'ERV est un pathogène significatif dans certaines circonstances, il est aussi inquiétant qu'il réussisse à transférer cette résistance au *S. aureus* et surtout au SARM, puisque la vancomycine est actuellement l'un des seuls antibiotiques efficaces contre le SARM. Les ERV sont activement recherchés au Québec.

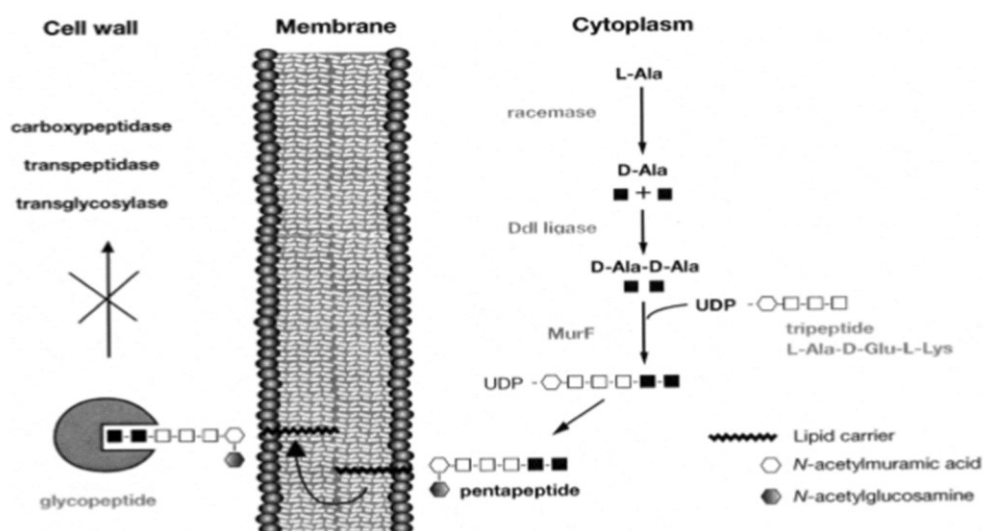
Afin de limiter la transmission nosocomiale de ces infections, plusieurs hôpitaux pratiquent le dépistage de ces microorganismes sur certains patients admis. Les patients porteurs du, ou des germes sont alors mis en isolement. À ces débuts, le dépistage se faisait à l'aide de géloses et de tests biochimiques sur les bactéries. Aujourd'hui, les méthodes moléculaires sont davantage utilisées notamment, grâce à leur grande rapidité et leur grande spécificité.

### 1.4.1 Les entérocoques résistants à la vancomycine

Le premier cas d'ERV a été reporté en Europe en 1988 (Courvalin, 2006). Par la suite, des souches similaires ont été dépistées chez des patients de la côte est des États-Unis (Courvalin *et al.*, 2006). Maintenant, l'ERV est retrouvé partout sur la surface du globe (Courvalin *et al.*, 2006). Les principaux gènes de résistance à la vancomycine se nomment *vanA* et *vanB* et codent pour une ligase (Courvalin *et al.*, 2006). Il existe également un gène de résistance *VanE*, mais celui-ci n'a pas de conséquence en milieu hospitalier. Ces deux gènes sont retrouvés sur le transposon Tn 1546 et Tn 1547 ou Tn 1549 pour le *vanB* (Courvalin *et al.*, 2006).

#### 1.4.1.1 Le mode d'action de la vancomycine

Telle que décrite précédemment, la synthèse de la paroi bactérienne requiert plusieurs étapes complexes pour la formation du peptidoglycane. Dans le cytoplasme, une racémase (isomérase) convertie le L-Alanine en D-Alanine (Cetinkaya *et al.*, 2000, Courvalin *et al.*, 2006). Au moment de l'élongation du pentapeptide, la ligase joint deux molécules D-Ala-D-Ala au reste de l'UDP-N-acétylmuramate (Courvalin *et al.*, 2006). À cet instant, le transporteur lipidique, l'undécaprénol-phosphate se lit au précurseur et s'ajoute à l'UDP-N-acétylglycosamine (Courvalin *et al.*, 2006). (Figure : 7)

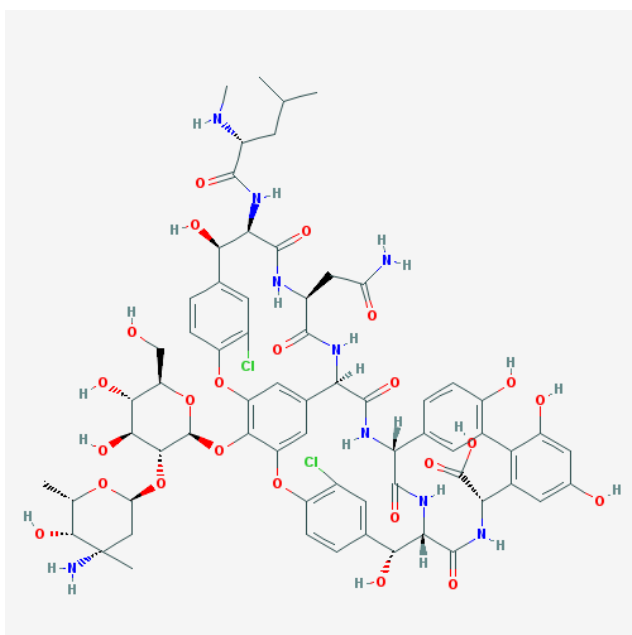


**Figure 7 : Synthèse du peptidoglycane et mécanismes d'action de la vancomycine**

La vancomycine inhibe la synthèse en se liant au dernier précurseur (disaccharide-pentapeptide) via le C-terminal D-ala-D-ala (Courvalin *et al.*, 2006) (Figure autorisée par l'auteur).



Puisque la vancomycine est une grosse molécule (Figure : 8), il est impossible pour elle d'entrer dans le cytoplasme de la bactérie et de se lier avec les précurseurs du peptidoglycane. D'ailleurs c'est pour cette raison que la vancomycine est utilisée uniquement contre les infections à bactéries Gram  $+$ . Pour que celle-ci agisse sur la bactérie, le précurseur du peptidoglycane devra se transposer de l'autre côté de la membrane cytoplasmique. La vancomycine a une forte affinité avec la partie C-terminale du D-Ala-D-Ala. Cette affinité déjoue l'action des transpeptidases nécessaires pour catalyser les ponts peptidiques entre les feuillettes du peptidoglycane (Courvalin *et al.*, 2006).



**Figure 8 : Structure moléculaire de la vancomycine**

Source: PubChem CID : 14969

URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

Description: Data deposited in or computed by PubChem (Image libre de droits d'auteur)

#### 1.4.1.2 Les mécanismes de résistance à la vancomycine

Le premier gène de résistance *van* à avoir été décrit dans la littérature est le *vanA* (Courvalin *et al.*, 2006). Notamment retrouvé sur le transposon Tn1546. Ce gène inductible est caractérisé par un haut taux de résistance à la vancomycine et à la teicoplanine (Cetinkaya *et al.*, 2000; Castillo-Rojas *et al.*, 2013). La valeur de la concentration minimale inhibitrice

(CMI) pour la vancomycine est  $\geq 64\mu\text{g/ml}$  et  $\geq 16\mu\text{g/ml}$  pour la teicoplanine (Cetinkaya *et al.*, 2000). Le niveau de résistance de la souche *vanB* est moindre que celle de la souche *vanA* (entre 4 à  $1000\mu\text{g/ml}$ ). Cependant, souche *vanB* est sensible à la teicoplanine (Cetinkaya *et al.*, 2000, Courvalin *et al.*, 2006).

Tel que décrit précédemment, la vancomycine cible le substrat contrôlé par l'enzyme qui détermine la structure des précurseurs, soit le D-Ala-D-Ala. La résistance à la vancomycine est due à la présence d'un opéron traduisant une ligase qui produit un précurseur de faible affinité pour l'antibiotique (Courvalin *et al.*, 2006). Au lieu de lier deux D-Ala, la ligase issue du gène de résistance liera un D-Ala avec un D-Lactate ou un D-Serine (selon le gène). Ce qui aura pour effet d'inhiber l'action de la vancomycine sur la paroi bactérienne (Courvalin *et al.*, 2006).

Également retrouvé sur cet élément génétique mobile (le Tn1546), le gène *vanH* code pour une déshydrogénase. Cette enzyme réduit le pyruvate présent en D-Lac. La ligase *vanA* catalyse ensuite le lien entre la D-Ala et la D-Lac. La classification des gènes de résistance *van* est déterminée par le type de ligase (Tableau 2). C'est ainsi qu'il est possible de distinguer différentes souches ERV. Seules les espèces *fæcium* et *fæcalis* sont considérées ERV (avec les gènes *vanA* et *vanB*) et elles sont d'intérêts cliniques.

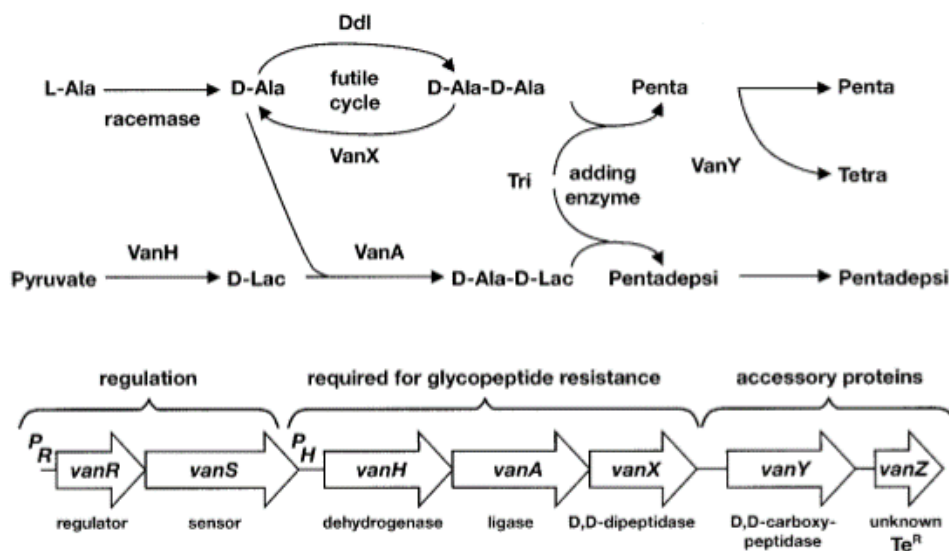
**Tableau 2 : Caractéristiques des gènes de résistances *van*.**

Strain characteristic	Acquired resistance level, type					Intrinsic resistance, low level, type VanC1/C2/C3
	High, VanA	Variable, VanB	Moderate, VanD	Low		
				VanG	VanE	
MIC, mg/L						
Vancomycin	64–100	4–1000	64–128	16	8–32	2–32
Teicoplanin	16–512	0.5–1	4–64	0.5	0.5	0.5–1
Conjugation	Positive	Positive	Negative	Positive	Negative	Negative
Mobile element	Tn1546	Tn1547 or Tn1549	...	...	...	...
Expression	Inducible	Inducible	Constitutive	Inducible	Inducible	Constitutive Inducible
Location	Plasmid chromosome	Plasmid chromosome	Chromosome	Chromosome	Chromosome	Chromosome
Modified target	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser

**NOTE.** D-Ala-D-Lac, D-alanine-D-lactate; D-Ala-D-Ser, D-alanine-D-serine.

(Courvalin *et al.*, 2006) (Reproduction du tableau autorisé par l'auteur)

Finalement, pour compléter ce système complexe, s'ajoute deux autres enzymes produites par la bactérie : vanX et vanY (Figure : 9) qui éliminent les précurseurs du D-Ala-D-Ala. La première enzyme : la DD-peptidase, hydrolyse les précurseurs D-Ala-D-Ala et la seconde enzyme : la DD-carboxypeptidase, retire le résidu C-terminal de l'acide aminé D-Ala lorsque l'action de vanX est incomplète (Courvalin *et al.*, 2006). La vancomycine perd alors son affinité avec les précurseurs du peptidoglycane et la synthèse de la paroi peut se poursuivre.



**Figure 9 : Représentation de l'opéron vanA**

La régulation du gène *vanA* est contrôlée par les gènes *vanR* et *vanS*. Le gène *vanH* réduit l'acide aminé D-Ala en D-Lac et le gène *vanA* lie le D-Lac au pentapeptide. Les gènes *vanY* et *vanX* hydrolyse et décarboxyle les précurseurs D-Ala-D-Ala (Courvalin *et al.*, 2006). (Schéma autorisé par l'auteur.)

#### 1.4.1.3 Résistances aux antibiotiques

Les entérocoques sont fréquemment résistants à plusieurs antibiotiques, notamment aux  $\beta$ -lactames (céphalosporines et les pénicillines résistantes aux pénicillinases), aux fluoroquinolones clindamycine, trimethoprim-sulfamethoxazole et à certains aminoglycosides (Cetinkaya *et al.*, 2000).

La résistance aux pénicillines est notamment due à la production de PBP5 qui possède une faible affinité pour les pénicillines (Cetinkaya *et al.*, 2000). Auparavant les espèces *fæcium* et *fæcalis* étaient souvent sensibles à la pénicilline et à l'ampicilline, aujourd'hui la CMI pour

*E. faecium* se situe entre 16 et 64µg/ml pour ces deux antibiotiques. Cette résistance est rarement due à la production de  $\beta$ -lactamase (NCCLS, 2000).

Finalement, ils ont acquis une résistance à haute concentration pour les aminoglycosides, les glycopeptides (vancomycine et teicoplanine), la tetracycline, l'erythromycine les fluoroquinolones, la rifampine, le chloramphenicol, l'acide fusidique et la nitrofurantoine (Cetinkaya *et al.*, 2000; Castillo-Rojas *et al.*, 2013).

#### **1.4.2 Diagnostic de l'entérocoque**

Appartenant anciennement au groupe D de Lancefield (Cetinkaya *et al.*, 2000), l'entérocoque peut croître à 10°C comme à 45°C, dans un pH de 9,6 et dans une solution saline de 6,5%. De plus, l'entérocoque peut hydrolyser l'esculine en présence de la bile (Cetinkaya *et al.*, 2000, Castillo-Rojas *et al.*, 2013; Facklam & Collins 1989).

##### *1.4.2.1 Diagnostic différentiel de E. faecium et faecalis*

Les entérocoques forment des colonies grises sur gélose au sang. Le test de catalase – et PYR (Pyrrolidonyl Arylamidase) + permet de distinguer ce cocci à Gram + en chaîne des autres Streptocoques. En plus des tests biochimiques cités précédemment, les tests de référence pour l'identification des *E. faecium* et *E. faecalis* sont l'hydrolyse de l'esculine dans la bile, l'utilisation du lactose, sucrose et le mannitol. 97% des souches *E. faecalis* utilisent le sorbitol contre 7% des souches *E. faecium*. De plus, 90% des souches *E. faecalis* résiste à la tellurite contre 0% pour l'*E. faecium*. (Facklam 1972).

Nous retrouvons sur le marché des galeries API (BioMérieux) sous forme de languettes et qui permettent d'analyser les différents sucres et autres tests biochimiques. Ces languettes aident à l'identification jusqu'à l'espèce du genre Entérocoque. BioMérieux offre également les cartes d'identification VITEK qui sont semblables aux galeries cependant elles sont semi-automatisées.

La méthode de référence implique l'utilisation d'un bouillon d'enrichissement Bile-esculine de la compagnie Oxoid. Cette méthode de dépistage demande la lecture des bouillons après 24h et 48h. Lors des premières 24h, nous observons le changement de couleur du bouillon.

Si le bouillon tourne au noir, c'est qu'il y a la présence d'un entérocoque qui a utilisé l'esculine et l'esculétine produit lors de sa dégradation réagit avec le citrate de fer contenu dans le milieu de produit alors la couleur noire. S'il n'y a pas de changement de couleur après 48h, nous disons qu'il y a absence d'ERV. Si le bouillon change au noir, le bouillon est sous-cultivé sur une gélose bile-esculine azide. Au jour suivant, nous recherchons les colonies noires sur le milieu de culture. Les colonies retrouvées sont ensuite identifiées par diverses méthodes telles que les galeries API de la compagnie BioMérieux.

#### *1.4.2.2 Dépistage par géloses chromogéniques*

Nous retrouvons depuis quelles années des géloses chromogéniques sur le marché qui permettent l'identification de l'ERV. Tel que décrit à la section 1.3.4, les géloses sont différentielles et sélectives pour la croissance de l'ERV. Nous retrouvons notamment la gélose Brillance VRE Agar d'Oxoid ainsi que la gélose ChromID de BioMérieux qui permet également de faire la distinction entre l'espèce *faecium* et *faecalis*. La croissance demande 24h à 48h d'incubation.

Puisqu'il s'agit de la détection améliorée du SARM et de l'ERV par PCR, une description simple des méthodes de détection par PCR sera définie dans la prochaine section.

### **1.5 Méthodes de détection par PCR en temps réel**

Pour la réalisation du projet, nos résultats ont été analysés par la réaction d'amplification en chaîne par la polymérase en temps réel (PCR en temps réel). La PCR est une méthode de détection des acides nucléiques soit (ADN ou ARN) et elle est souvent utilisée en biologie moléculaire (Ameziane *et al.*, 2005).

#### *1.5.1 Quantification et semi-quantification*

La PCR en temps réel est basée sur la PCR en end point. Cependant, contrairement à la PCR end point où il n'est pas possible de suivre l'évolution de l'amplification, l'appareil prend des mesures d'acquisition de la fluorescence à chaque cycle. La PCR en temps réel permet de voir la progression de l'amplification de l'ADN cible à chaque cycle. La méthode d'amplification par PCR permet d'accroître le nombre de copie un fragment d'ADN en

particulier (séquence d'intérêt ou ADN cible) à partir d'un ADN matriciel. En utilisant une copie d'ADN, il est possible de produire des milliards de copies de ce même segment d'ADN et permet ainsi son analyse.

Puisqu'il est possible de suivre l'évolution de la réaction en temps réel, plusieurs types de PCR ont été développés afin de répondre aux besoins de leurs utilisateurs. Il existe la PCR en temps réel quantitative (PCR) qui est souvent employée lorsque l'on veut faire l'étude de l'expression génique au moyen de la RT-PCR (retro-transcriptase-PCR). Ainsi, on tente de mesurer la quantité d'ARN transcrit par la cellule. Les protocoles de RT-PCR sont rigoureux notamment sur la préparation des échantillons afin d'éviter, par exemple, l'action d'une ARNase (IDT) qui pourrait dégrader l'ARN de transfert (ARNt). De plus, la valeur du Ct (*cycle threshold*) ou Cp (*Crossing point*) du spécimen doit être comparée à une courbe de concentration standard, permettant de déterminer la concentration initiale de l'échantillon. La courbe de concentration standard est produite grâce à une série de dilution et elle est établie par le logiciel du thermocycleur. Les valeurs de Ct (ou de Cp) peuvent être comparées à la courbe standard comme mentionnée plus haut pour obtenir une concentration exacte (PCR quantitative) ou comparée à un spécimen contrôle au moment de l'expérience (PCR semi-quantitative).

Contrairement à la PCR, la PCR semi-quantitative permet simplement de déterminer s'il y a présence de la cible dans notre échantillon ou pas. Les analyses décrites dans ce présent mémoire sont basées sur une PCR semi-quantitative en temps réel. L'enjeu est de détecter la présence des bactéries nosocomiales chez les bénéficiaires du centre hospitalier associé au projet. Comme il le sera décrit à la section MATÉRIELS ET MÉTHODES, nous avons établi une valeur seuil afin de déterminer si le patient est porteur ou non de la bactérie.

### 1.5.2 Réaction PCR

Le mélange réactionnel (*MasterMix*) (IDT) de la PCR en temps réel, comprend l'extrait d'ADN (ADN matriciel), la Taq polymérase : enzyme nécessaire pour copier les brins d'ADN, des amorces qui initient l'amplification par la taq polymérase, quatre désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) en excès, une solution tampon et finalement une molécule fluorescente (sondes, SYBR Green, etc.) en quantité suffisante afin de suivre la progression de la réaction.

L'amorce est une séquence d'oligonucléotides d'environ 15 à 20 bases complémentaire au brin d'ADN cible. Le design des amorces (et/ou sonde) doit être étudié afin d'éviter le mésappariement amorce-amorce, amorce-sonde ou autres combinaisons affectant ainsi l'efficacité de la réaction. Certaines amorces ou sondes peuvent se replier sur elles-mêmes et empêcher l'amplification de l'ADN.

Le mélange réactionnel est soumis à différents cycles de température opérés par le thermocycleur (l'appareil PCR). Généralement, un cycle d'amplification PCR correspond à trois phases qui sont coordonnées par trois changements de température distincts : 95°C : ouverture des brins, 58°C : hybridation des amorces sur la cible et 72°C : élongation du brin complémentaire à la cible grâce à la taq polymérase.

L'acquisition de la fluorescence peut avoir lieu lors de la phase d'hybridation (58°C) ou lors de la phase d'élongation (72°C). L'utilisation d'une sonde (Taqman, Molecular Beacon, etc.) ou d'un agent intercalant (ex. SYBR Green, *High Resolution Melting*) déterminera la phase où l'acquisition sera prise par le thermocycleur. Les agents intercalants sont des molécules qui émettent leur fluorescence uniquement lorsqu'ils s'insèrent dans la molécule d'ADN nouvellement formée (double brin). À l'instar de ces agents, les sondes émettent également de la fluorescence. Cependant, elles ne s'insèrent pas dans l'ADN bicaténaire, mais s'hybride avec l'ADN simple brin.

Les sondes peuvent être comparées aux amorces cependant, elles comportent un fluorophore situé à l'extrémité 5' et sont composées de didésoxyribonucléosides triphosphates (ddNTP) ce qui empêchent la Taq polymérase de s'y lier pour former un nouveau brin. Il existe

plusieurs variétés de sondes sur le marché : par exemple; les sondes Molecular Beacon™, Scorpion™ et les sondes de type TaqMan©. Les sondes TaqMan™ sont marquées d'un fluorophore à l'extrémité 5' et par un étouffeur (*quencher*) à l'extrémité 3'. Généralement, la longueur de la sonde est d'environ 12-18 nucléotides. Au début de la réaction, due à la petite taille de la sonde, le quencher empêche le fluorophore d'émettre sa lumière lorsque celui-ci est excité par une longueur d'onde émise par l'appareil. La sonde hybridée sur sa cible est clivée au passage de la Taq polymérase, grâce à son activité exonucléase à l'extrémité 5', ce qui libère le fluorophore. À la fin de ce cycle, la Taq polymérase aura dégradé entièrement la sonde. Ne subissant plus l'action du quencher, le fluorophore peut émettre à son tour une longueur d'onde qui sera captée par l'appareil. Il est important de noter que la position de la sonde, sur le brin, par rapport à l'amorce influence le moment de l'acquisition de la fluorescence.

À l'instar des sondes TaqMan™, les sondes Molecular Beacon™ sont également marquées d'un fluorophore à l'extrémité 5' et d'un quencher en 3'. Cependant, les sondes de type Molecular Beacon™ sont plus longues et leur conception leur permettent de se replier sur elle-même lorsqu'elles ne sont pas hybridées sur la cible. Dans cette conformation, la sonde n'émet pas de longueur d'onde. Par contre, une fois la sonde hybridée sur l'ADN cible, le quencher et le fluorophore se retrouvent séparés, ce qui annule son effet. Le fluorophore peut enfin émettre sa lumière. L'un des avantages de la sonde de type Molecular Beacon, c'est qu'elle se détache de sa cible lorsque la température augmente. La préservant ainsi de toute digestion par la Taq polymérase, la sonde est présente en quantité suffisante pour effectuer une courbe de dénaturation (*melting curve* ou coube TM).

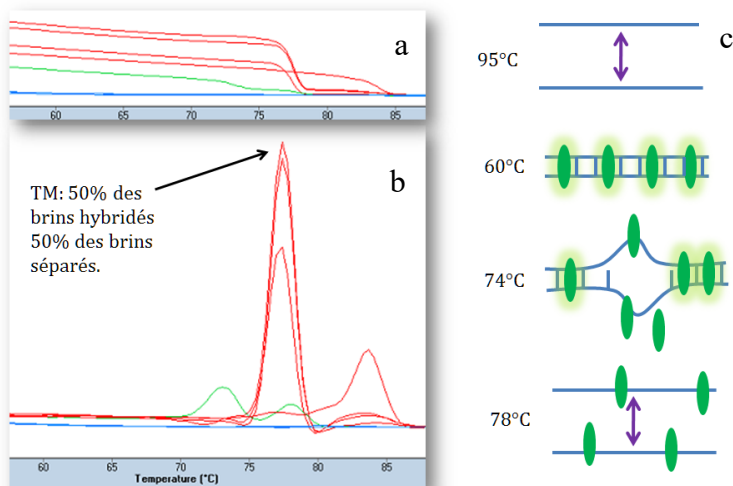
### ***1.5.3 Courbes de dénaturation***

Les courbes de dénaturation qui donnent le TM (*melting temperature*) servent de complément à l'amplification du gène d'intérêt par PCR. L'analyse est basée sur la température nécessaire pour dénaturer le brin double d'ADN. La température de TM d'une amorce, d'une sonde ou d'un produit PCR est dépendante de la longueur de l'oligonucléotide (ou du brin d'ADN), de son pourcentage en nucléotides G-C/A-T et de la séquence de ceux-ci. Puisqu'il y a trois liaisons covalentes entre les nucléotides G-C contrairement à deux liaisons entre les nucléotides A-T, il faut davantage d'énergie pour briser les liens entre les nucléotides G-C.



L'énergie nécessaire pour briser un lien G/C est de 4°C contrairement à un lien A/T qui est de 2°C. De plus, il est plus difficile de briser un lien A/T si celui-ci est entouré de liens G/C. Il est possible de calculer les valeurs de  $T_M$  des nucléotides (sondes et amorces) et des brins d'ADN grâce à des algorithmes mathématiques disponibles sur le net (IDT). L'efficacité d'une PCR est étroitement liée au design de ses oligonucléotides, à leur température de dénaturation et de leurs interactions entre eux.

Cette dernière étape PCR est facultative puisque, selon le type de sondes utilisées : TaqMan™, Molecular Beacon™, etc., cette étape peut ne pas être possible. Au début du cycle de  $T_M$ , la température de la réaction est de 95°C durant 60 sec. Cette étape est nécessaire afin de séparer tous les brins doubles, les brins hybridés avec des sondes. Par la suite, la température descend rapidement autour de 60°C, ce qui aura pour effet l'hybridation des brins entre eux ou les brins avec la sonde (selon la méthode de détection). Les agents intercalants et les sonde émettent leur fluorescence. À ce moment de l'analyse, la fluorescence est au maximum. À partir de cette température seuil, la température augmente graduellement et l'appareil capte l'émission de la fluorescence selon une fréquence précise. Avec l'augmentation de la température, les oligonucléotides sont de plus en plus instables et commencent à se séparer l'un de l'autre (Figure : 10). Ceci entraîne une perte de la fluorescence. L'appareil PCR enregistre cette perte de fluorescence et convertit la mesure sous forme de pic. Le pic de fluorescence correspond à la température où 50 % des molécules sont hybridées avec leur cible et où 50 % des molécules sont libres. Les courbes de  $T_M$  ajoutent de la sensibilité à la PCR, elle agit un peu comme une empreinte correspondant au produit PCR.



**Figure 10 : Représentation schématique des courbes de dénaturation**

- a) Perte de fluorescence enregistrée par l'appareil PCR
- b) Conversion mathématique sous forme de pic : Le pic de TM correspond à 50% des brins hybridés et 50% des brins séparés.
- c) Représentation schématique au niveau moléculaire : En ouvrant, les brins libèrent le SYBR Green qui perd alors sa fluorescence.

## 1.6 Recensement des écrits

Dans cette section, les nouvelles méthodes de détection par PCR du SARM et de l'ERV seront abordées. Les différentes études qui se sont intéressées à l'enrichissement (en bouillon) des bactéries SARM ou ERV seront également abordées.

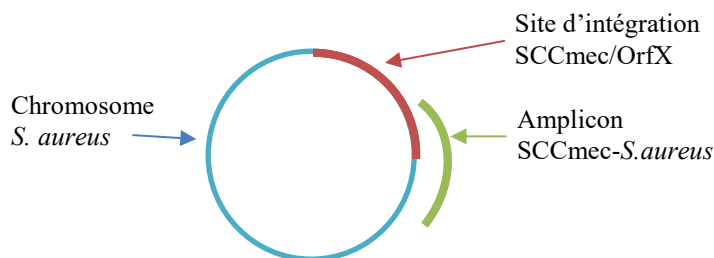
### 1.6.1 Méthode de détection actuelle

Aujourd'hui l'analyse par PCR est considérée comme étant la méthode de référence (Arbique *et al.* 2001). La section suivante énumère les différentes méthodes PCR disponibles commercialement et en recherche.

#### 1.6.1.1 Dépistage par PCR : les méthodes commerciales

Sur le marché, une proportion importante de trousses commerciales permet la détection par PCR en temps réel du SARM ou de l'ERV. Pour la détection du SARM, il existe des trousses d'agglutination aux billes de latex de la PBP2a, de nombreuses trousses de détection par PCR. Il est également possible de retrouver des géloses chromogènes (chromAgar : Oxoid) pour la détection du SARM ou pour l'ERV.

Plusieurs stratégies ont été imaginées par les compagnies de développement pour faire le dépistage du SARM le plus rapidement et le plus efficacement. Actuellement les trousses retrouvées sur le marché détectent le site d'intégration de la cassette SCCmec au niveau de l'OrfX et une partie de l'amplicon produit par les amorces de ces trousses inclus une séquence d'ADN de la bactérie *S. aureus* sensible aux antibiotiques. (Cuny 2005) L'OrfX (*Open reading frame X*) est un segment génétique dont la fonction n'est pas encore connue et qui sépare deux codons-stop (Ameziane *et al.* 2005; Boundy *et al.*, 2012) (Figure : 11). De cette façon, la compagnie d'assure d'avoir amplifié le gène de la résistance à la méticilline ainsi que le *S. aureus*. L'avantage avec cette méthode de dépistage, c'est qu'il n'est pas nécessaire de sous-cultiver le bouillon d'enrichissement et de confirmer la présence d'un vrai SARM. Les compagnies telles que Roche Diagnostics (Indianapolis, IN, É-U) et Cepheid emploient cette stratégie dans leur trousse de dépistage du SARM.



**Figure 11 : Représentation schématique du site des amorces utilisées par certaines compagnies.**

Le site d'intégration de la cassette SCCmec se retrouve au niveau de l'*OrfX*.

#### 1.6.1.2 Dépistage par PCR : méthodes utilisées en recherche

Les méthodes d'amplification maison utilisent la détection des gènes spécifiques à la bactérie *S. aureus* et le gène de résistance *mecA*. Dans son article, Martineau *et al.*, 1997 utilise des séquences provenant d'une zone hautement conservée dans l'ARNr du 16S.

Notre méthode de référence amplifie le gène de la thermonucléase spécifique au *S. aureus*. L'avantage d'utiliser un gène hautement conservé c'est qu'il y a peu de chance que le gène mute et que la PCR ne soit plus en mesure de le détecter. Cela évite également que la cassette staphylococcique s'insère dans un autre site d'intégration. Le désavantage, cependant, c'est que nous devons sous-cultiver le spécimen afin d'analyser une seule bactérie. Le gène de résistance doit être présent dans la même bactérie que le gène spécifique au *S. aureus*.

#### 1.6.1.3 Méthode de référence utilisée au CHUS

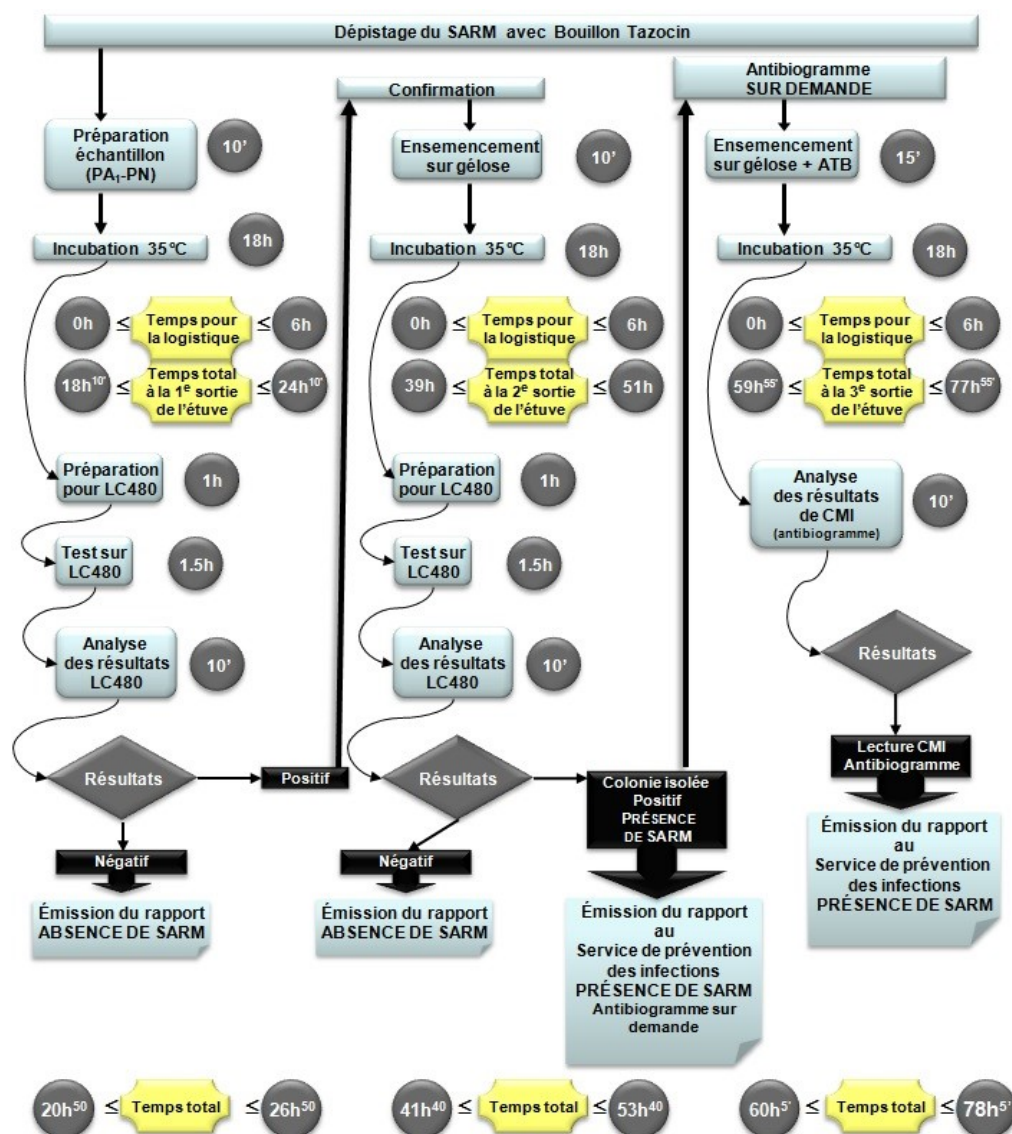
La méthode actuellement utilisée au laboratoire de microbiologie clinique du CHUS nous servira de référence dans le cadre de cette étude. Le CHUS utilise deux bouillons d'enrichissement distincts pour la détection des bactéries SARM et ERV. Le bouillon (développé par Frost et Deslandes) pour la détection du SARM contient du sel pour inhiber partiellement les Entérobactéries et la combinaison des antibiotiques Pipéracilline-Tazobactam (Tazocin), antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactames qui inhibent, entre autres, la croissance des *S. aureus* sensible à la méticilline ainsi que la plupart des Entérobactéries.

Néanmoins, ce bouillon ne permet pas la croissance de tous les entérocoques notamment les *E. faecalis* peuvent être sensibles à cet antibiotique (Murray, 1992; Sarti *et al.*, 2012). Pour ces raisons, le bouillon utilisé pour la détection du SARM du CHUS est un mauvais candidat empêchant ainsi la croissance simultanée de ces deux bactéries d'intérêts.

En ce qui concerne le bouillon d'enrichissement pour les ERV, il est supplémenté de bile, d'esculine, de fer ainsi que de la vancomycine. L'esculine est une molécule d'esculétine liée avec une molécule de glucose hydrolysée par certaines bactéries (Farmer *et al.*, 1992). Il s'agit d'un milieu sélectif pour la croissance des *Streptococcus* du groupe D de Lancefield, dont les Entérocoques. Il inhibe également les bactéries à Gram + tels que le *S. aureus*. Les SARM sont également inhibés par la vancomycine. Ce bouillon n'est donc pas le bon milieu pour la croissance simultanée de nos deux bactéries.

Un milieu de culture peut être sélectif et/ou différentiel. Un milieu sélectif permet uniquement la croissance de la bactérie d'intérêt. Les antibiotiques et les différentes concentrations de chlorure de sodium sont des exemples d'agents permettant d'augmenter la sélectivité d'un milieu de culture. De ce fait, le milieu inhibe la croissance de microorganismes non souhaités. Un milieu différentiel permet de faire la distinction entre deux microorganismes poussant dans le même milieu. Par exemple, le bouillon bile-esculine permet la différenciation des bactéries qui hydrolysent l'esculine (esculétine + glucose) grâce à la coloration noire du milieu après fixation de l'esculétine et le fer présent dans le milieu de culture. Si la bactérie présente dans le milieu n'utilise pas l'esculine, le milieu restera inchangé. Un second exemple ; la gélose de type MacConkey© permet également de différencier les colonies grâce à l'indicateur de pH (rouge neutre) contenu dans la gélose. En utilisant le lactose présent, la bactérie acidifie le milieu et l'indicateur de pH passe du rose-saumon à jaune. La colonie bactérienne prend une coloration rose-fuchsia (<http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/2855-macconkey-agar-plates-protocols> ). Enfin, un milieu de culture peut également enrichir le spécimen étudié en offrant les composantes de bases spécifiques pour la croissance de la bactérie étudiée. Nous souhaitons avantager la croissance des bactéries SARM et ERV et inhiber la croissance des bactéries présentes dans les selles.

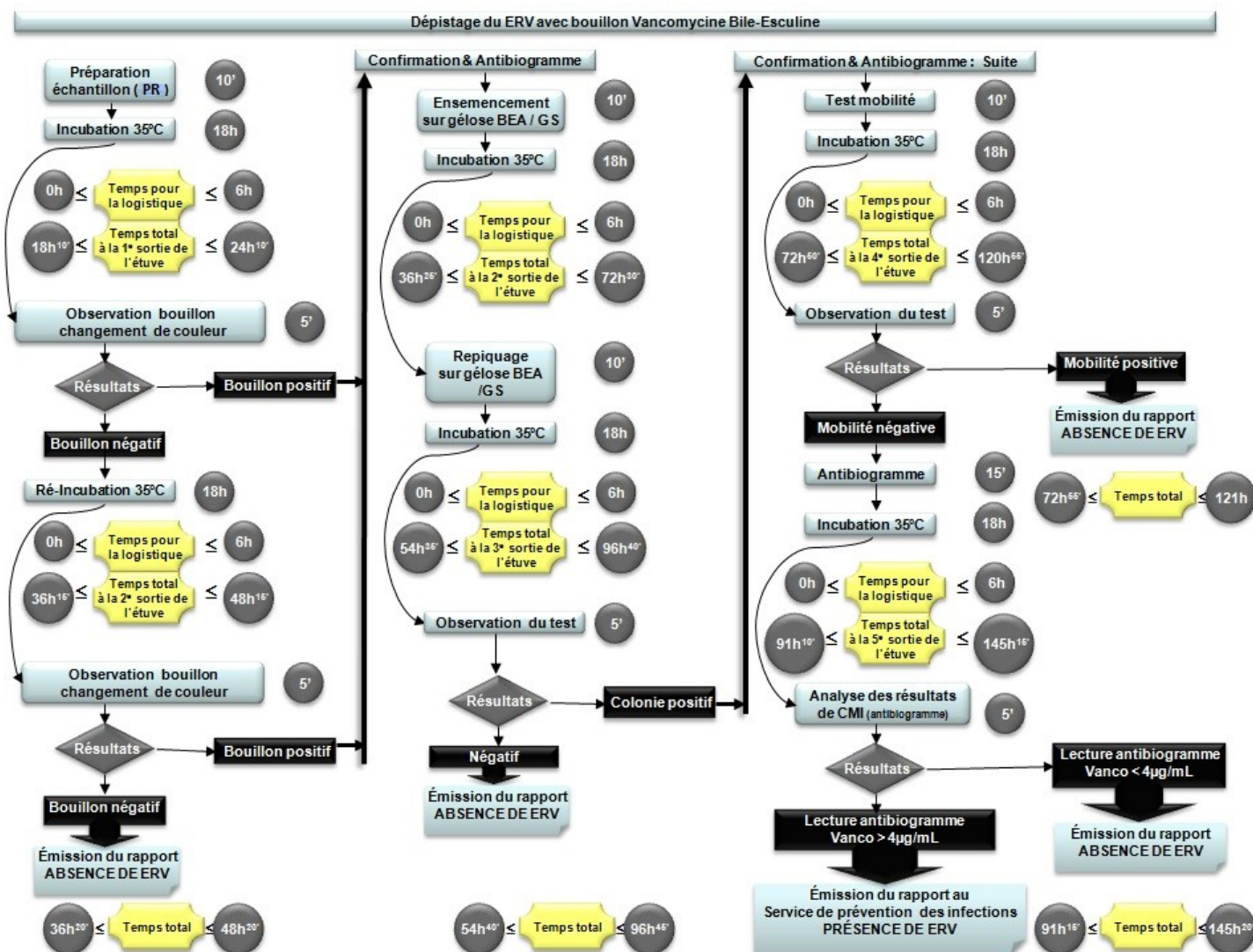
Le schéma suivant représente les étapes d'analyse pour le dépistage du SARM au laboratoire de microbiologie clinique du CHUS.



**Figure 12 : Schéma représentant les étapes pour le dépistage du SARM au laboratoire clinique du CHUS.**

Ensemencement du bouillon d'enrichissement SARM avec Tazocin. PA : prélèvement anal. PN : Prélèvement nasal. Après incubation d'une nuit à 35°C, le bouillon de détection des SARM subi une extraction à base d'éthanol et d'hydroxyde de sodium (lyse alcaline). Les détails de l'extraction seront décrits dans la section 3.2.1. L'ADN des bactéries présentes dans le bouillon d'enrichissement a été analysé par PCR en temps réel. Les détails de la PCR seront décrits dans la section 3.2.1. S'il y a présence des deux gènes d'intérêt pour le SARM : le gène de la thermonucléase (*nuc*) et le gène de résistance à la méticilline (*mecA*), le bouillon sera ensemencé sur une gélose spécifique au SARM. Après une seconde d'incubation de 18 à 24 h, si la gélose présente des colonies spécifiques au SARM, une confirmation a été effectuée par PCR.

Ce schéma-ci représente les étapes nécessaires pour l'identification d'un ERV au laboratoire de microbiologie clinique.



**Figure 13 : Schéma représentant les étapes pour le dépistage de l'ERV au laboratoire de microbiologie clinique.**

Ensemencement du bouillon d'enrichissement d'ERV de la compagnie Oxoid contenant de la vancomycine (6 µg/ml) et de la bile-esculine tel qu'utilisé actuellement en microbiologie clinique du CHUS. PR : Prélèvement rectal.

Le dépistage de l'ERV est plus ardu que celui du SARM. En effet, le dépistage se fait toujours selon les méthodes bactériologiques. Plusieurs milieux sélectifs aux ERV sont ensemencés. Le dépistage débute avec l'ensemencement du bouillon Vancomycine, bile-esculine de la compagnie Oxoïd avec un prélèvement rectal du patient et mis à l'étuve à 35°C. Selon le protocole du laboratoire de microbiologie clinique, le bouillon d'enrichissement doit devenir noir avant 48 h afin de poursuivre les analyses. Dans le cas où le bouillon ne devient pas noir (couleur inchangée), alors le résultat est négatif ; il y a absence de la bactérie ERV. Un minimum de 48 h est nécessaire pour avoir les premiers résultats négatifs. Cependant, plus d'une semaine peut s'écouler avant de confirmer la présence de la bactérie ERV chez un spécimen de patient.

### ***1.6.2 Revue de la littérature***

Dans une étude menée en 2008 au Danemark (Böcher *et al.*, 2008), les chercheurs ont comparé deux bouillons d'enrichissement préalablement utilisés avant l'ensemencement de quatre différentes géloses commerciales spécifiques à la croissance du SARM. L'étude constate que l'utilisation du bouillon d'enrichissement (avec antibiotique) permet d'accroître la sensibilité du test. Le premier bouillon, mannitol rouge de phénol (PHMB) contient 5 µg/mL de ceftizoxime (Famille des β-lactames, céphalosporine de troisième génération) et 75 µg/ml d'aztréonam (Monobactam). Le second bouillon étudié contient 3,5 µg/ml de cefoxitine (Céphalosporine de 2<sup>ème</sup> génération) ainsi que 20 µg/ml d'aztréonam dans un bouillon Tryptone-soya (TSB). Selon les auteurs, le second bouillon offre une meilleure sensibilité en raison du plus faible taux d'aztréonam. Bien que la bactérie y soit résistante, il est possible que la concentration trop élevée de l'antibiotique inhibe (ou perturbe) sa croissance. En outre, l'équipe mentionne que le bouillon TSB peut facilement s'employer avec la méthode de détection par PCR. L'article se termine en disant que : même avec la nouvelle ère de détection rapide par techniques moléculaires, l'étape d'enrichissement (en bouillon) demeure avantageuse (Böcher *et al.*, 2010).

Une seconde étude menée par un groupe de recherche en Belgique, conclue que l'incubation en bouillon pendant 4h ne permet pas la détection des bactéries de façon significative par rapport à la détection sur géloses spécifiques sans pré-enrichissement du spécimen en



bouillon. Cependant, ils suggèrent une incubation d'une nuit (*over night*) permettrait d'accroître de 25 % la détection bactérienne (Van Heirstraeten *et al.*, 2009). Les chercheurs utilisent le bouillon TSB supplémenté d'aztréonam et de cefoxitine. L'étude menée par cette équipe est uniquement axée sur la détection et l'identification du SARM. Celle-ci a été effectuée à l'aide de géloses commerciales utilisées exclusivement pour la croissance du SARM. Bien que ce bouillon permette également la croissance de l'ERV, l'étude n'aborde pas ce sujet.

Dans un article paru dans le *Journal of Clinical Microbiology* en 2003, l'équipe australienne de Pr. Palladino a comparé les résultats (par détection du gène *Van*) des spécimens avant incubation et après incubation en utilisant un bouillon Vancomycine-Bile-Esculine (Palladino *et al.*, 2003). La concentration de la vancomycine dans le bouillon était de 8 µg/ml. Dans la section des résultats, les auteurs soutiennent que la sensibilité de la PCR pratiquée directement sur le spécimen est inférieure à la sensibilité de la PCR pratiquée sur le bouillon d'enrichissement (45 % et 88 % respectivement).

L'équipe de Thomas J. Novicki, de l'Université de Washington, discute également de l'utilisation du bouillon d'enrichissement pour les ERV dans leur article paru en 2004 (*Journal of Clinical Microbiology*). Ils proposent une alternative au bouillon commercial vancomycine-bile-esculine pour les laboratoires où ce bouillon ne serait pas disponible. Ils suggèrent de mettre un disque d'antibiotique de 30 µg de vancomycine dans 2 ml de bouillon sélectif Bile-Esculine-Azoture (BEA). Cependant, la bile-esculine ne permet pas la croissance des Gram + autre que les *Streptococcus* du groupe D de Lancefield. Par conséquent, le *S. aureus* ne s'y développe pas. En conclusion, l'équipe de l'Université de Washington rappelle que la sensibilité de la méthode d'enrichissement par bouillon s'avère supérieure à la méthode d'ensemencement direct sur géloses pour détecter les ERV.

Cependant, une équipe allemande, en 2011, spécifie qu'il est nécessaire d'avoir une incubation de 42 à 52 h pour une détection de 96 % (167/173) des spécimens positifs. Contrairement à une détection de seulement 40 % (67) des spécimens lors d'une incubation de 18 à 28 h. La concentration de la vancomycine est de 4µg/ml dans le bouillon d'enrichissement (Werner *et al.*, 2011).

Plusieurs études ont démontré que l'utilisation d'un bouillon d'enrichissement améliore la détection de ces bactéries chez les porteurs sains (Novicki, *et al.*, 2004). Selon une équipe de recherche qui a travaillé sur le SARM, les chercheurs affirment qu'une incubation (en bouillon) des prélèvements d'au moins 18h-24 h, augmente de 25 % la détection des SARM (Van Heirstraeten, *et al.*, 2009).

Enfinement en 2009, une équipe de chercheurs du Danemark a évaluée deux bouillons d'enrichissement pour la détection du SARM et les ont comparés à l'ensemencement directement sur géloses spécifiques à la croissance du SARM (Böcher *et al.*, 2008). Le premier bouillon est non-sélectif et le second contient de l'aztréonam (20 µg/ml) et de la cefoxitine (3,5 µg/ml). Les chercheurs ont par la suite ensemencé 100 µl des bouillons sur une gélose ChomID MRSA et sur une gélose Columbia sheep blood (BA). En utilisant une pré-incubation avec le bouillon enrichi d'aztréonam et de cefoxitine et la gélose ChromID, les faux positifs diminuent de 4 à 1 et la sensibilité augmente de 69,6 % à 82,1 % comparée à la gélose ChromID seule. L'équipe conclue l'article en spécifiant que le bouillon enrichit en antibiotiques en pré-incubation est plus sensible qu'une détection directe.

Ainsi, tel que le démontre ces publications, l'utilisation d'un bouillon d'enrichissement permettant la multiplication des bactéries recherchées améliore la détection de ces-dernières, que ce soit par méthode moléculaire ou autres.

### ***1.6.3 Épidémiologie des SARM et des ERV***

Depuis quelques années, ces deux microorganismes font l'objet d'une surveillance accrue de la part des autorités sanitaires du monde entier. Effectivement, elles sont responsables d'infection nosocomiales qui constituent une cause majeure de complication des soins de santé avec, comme conséquences, une augmentation de la mortalité et de la morbidité, une prolongation de l'hospitalisation et une hausse importante des coûts de santé (INSPQ) (Lévesque *et al.*, 2010). Selon les résultats de surveillances de 2013-2014 de l'Institut national de santé publique du Québec (INSPQ), les bactériémies nosocomiales associées au SARM sont responsables d'une létalité de 30,3 % sur les 97 bactériémies déclarées durant cette même période (Lévesque *et al.*, 2010). En 2012-2013, selon le rapport de surveillance de l'ERV, 36,6 % (41) des 112 cas rapportés à l'INSPQ étaient dus à une acquisition de la souche ERV lors d'une hospitalisation actuelle ou antérieure dans l'installation déclarante (Lévesque *et al.*, 2010), 15,2 % (17) ont été retrouvé dans une bactériémie, 26,8% (30) ont été responsable d'infections urinaires et 18,8 % (21) des complications de l'infection à ERV ont causé le décès chez les patients hospitalisés (Lévesque *et al.*, 2010).

## PROBLÉMATIQUE & OBJECTIFS

### 2.1 Problématique

Le SARM et l'ERV sont deux bactéries responsables d'infections nosocomiales importantes. Elles sont retrouvées au sein des différents centres hospitaliers à travers le monde et leur présence cause de grands problèmes en santé publique (INSPQ). Elles constituent notamment une cause majeure de complication des soins de santé avec, en conséquence, une augmentation de la mortalité et de la morbidité, une prolongation de l'hospitalisation et une hausse importante des coûts de santé (INSPQ).

Nous n'avons pas à ce jour trouvé dans la littérature de références à un bouillon d'enrichissement unique qui permet et favorise la croissance du SARM et de l'ERV. De plus, il n'existe pas de trousse de dépistage commercialement disponible qui permet la détection simultanée de ces bactéries multi-résistantes. L'utilisation d'un bouillon d'enrichissement améliore la détection de ces bactéries chez les porteurs sains (Novicki *et al.*, 2004), de plus ce type d'incubation pendant au moins 18 à 24 h, augmente de 25 % la détection des SARM (Van Heirstraeten *et al.*, 2009). Bien que plusieurs articles décrivent l'importance de faire une croissance sélective ou semi-sélective de la bactérie avant de poursuivre la détection des bactéries par méthode PCR en temps réel (Böcher *et al.*, 2008, Böcher *et al.*, 2010, Van Heirstraeten *et al.*, 2009), il n'existe pas de trousse en PCR multiplexes permettant l'identification des 2 germes.

Le problème consiste donc à concevoir une méthode de détection qui permettrait de combiner le dépistage des 2 microorganismes simultanément et qui permettrait de réduire le temps et les coûts de détection. Il est également nécessaire de valider cette méthode basée sur les normes actuelles (Clark *et al.*, 2002). L'utilisation éventuelle d'une telle méthode d'analyse et de détection permettrait d'améliorer la prévention et le contrôle de ces infections.

## 2.2 Objectifs

### *Objectif 1 : Élaboration d'un bouillon d'enrichissement pour le SARM et l'ERV*

Le premier objectif était de créer un bouillon d'enrichissement permettant la croissance du SARM et de l'ERV. Les bouillons actuellement utilisés en laboratoire clinique permettent la croissance de l'une de nos bactéries d'intérêt, par contre il inhibe la croissance de l'autre. Le but de cet objectif est de créer un bouillon qui permet la croissance des deux bactéries d'intérêt simultanément.

### *Objectif 2 : Élaboration d'une PCR en multiplexe en temps réel*

Actuellement, il n'existe pas de trousse commerciale qui permette la détection concomitante par PCR en temps réel des deux bactéries nosocomiales SARM et ERV. L'objectif est de concevoir une PCR capable d'amplifier les gènes de résistance du SARM et de l'ERV incluant un contrôle interne dans chacun des puits. Et ce, dans une même PCR, en multiplexe.

### *Objectif 3 : Validation du bouillon d'enrichissement*

L'objectif de cette partie de l'étude est de valider le milieu d'enrichissement expérimental développé au laboratoire de recherche, en comparaison avec les bouillons utilisés au laboratoire clinique et les trousses commerciales disponibles sur le marché. Notre hypothèse est que le nouveau bouillon d'enrichissement est aussi efficace, voire plus, que le bouillon de détection des SARM utilisé actuellement au laboratoire clinique. Cependant, en plus de la détection du SARM, le nouveau bouillon permettra également l'enrichissement de l'ERV.

Pour mener à bien une validation du bouillon d'enrichissement, conforme aux consignes du *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), un minimum de 200 spécimens, dont 50 SARM positifs, 50 ERV positifs et 100 spécimens négatifs sont nécessaires (Clark *et al.*, 2002).

*Objectif 4 : Validation de la PCR en multiplexe en temps réel*

Cet objectif se scinde en deux parties : la validation de la PCR SARM en simplex sur le LC480 de Roche et la validation finale de la PCR SARM et ERV en multiplexe sur le LC480 de Roche.

*Objectif 4a : Validation de la nouvelle PCR multiplexe*

Reprendre les spécimens obtenus lors de la validation du bouillon d'enrichissement et de ré-analyser ces spécimens avec la nouvelle PCR multiplexe. La nouvelle PCR permet d'amplifier le gène de résistance du SARM, le *mecA*, la nouvelle cassette SCC XI : le *mecC*, le gène *nuc* spécifique aux *S. aureus*, les gènes de résistance du ERV, le *vanA* et le *vanB*. La nouvelle PCR inclus également un contrôle interne permettant d'avoir l'assurance que la réaction PCR a bien fonctionnée, c'est-à-dire sans inhibiteur présent lors de la réaction, ce qui nous assure que le spécimen a bien été ajouté dans le puits de la plaque PCR.

*Objectif 4b : Adaptation de la PCR sur la nouvelle plateforme LC480 de Roche Diagnostics*

Adapter la technique d'analyse PCR en temps réel du laboratoire clinique du CHUS sur le nouvel appareil LightCycler 480 de Roche Diagnostics. Valider la méthode avec un nombre significatif de spécimens. (MATÉRIELS & MÉTHODE et les RÉSULTATS sont à l'ANNEXE I)

## MATÉRIELS & MÉTHODES

La section Matériel & Méthodes sera subdivisée en trois sous-sections. Premièrement, le volet sur l'élaboration du bouillon d'enrichissement sera abordé. Deuxièmement, le volet sur la validation du bouillon d'enrichissement. Et troisièmement, le volet sur le développement de la PCR en temps réel.

### 3.1 Optimisation du bouillon de culture d'enrichissement

Dans le tableau suivant se retrouve la composition des milieux d'enrichissement (bouillons et géloses) de même que la composition chimique des solutions.

#### Liste des solutions et des milieux

<b>Milieu d'enrichissement</b> <b>(Bouillon neutre)</b>	<b>1,5% (p/v) tryptose, 0,25% (p/v) <i>Neutralized liver digest</i>, 0,5% (p/v) extrait de levure, 25g/L chlorure de sodium (Oakville, ON, Canada ), 1% (p/v) mannitol</b>
<b>Solution d'extraction</b>	63% (v/v) éthanol, 0,20M NaOH, 25mM EDTA-Na <sub>2</sub>
<b>Solution Triton-Tween</b>	0,1mM EDTA-Na <sub>2</sub> , 50mM Tris-HCl, 1% Triton-x-100, 0,5% Tween-20, Q <sub>sp</sub> H <sub>2</sub> O
<b>Solution Tris-EDTA (TE 10:1)</b>	10mM Tris pH 8, 1mM EDTA, Q <sub>sp</sub> H <sub>2</sub> O
<b>Gélose au sang Oxoid</b>	
<b>Gélose bile esculine Oxoid</b>	
<b>Gélose <i>mannitol salt</i> Oxoid</b>	
<b>Gélose <i>Mac Conkey</i> Oxoid</b>	
<b>Saline NaCl 0,9% (Mississauga, ON, Canada )</b>	
<b>Bactéries utilisées</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus</i>

---

*gallinarum* et *Staphylococcus*.

*saprophyticus*

---

**Identification des bactéries :**

Coloration de Gram, test de la catalase, test de PYR (Remel, Lenexa, KS, É-U ), Test d'agglutination *S. aureus* (Bio-Rad)

### ***3.1.1 Méthode de production in vitro des spécimens***

La concentration des bactéries qui sera ajoutée aux bouillons d'enrichissement lors des essais a d'abord été déterminée. Nous souhaitons reproduire un spécimen clinique similaire au site de prélèvement avec une faible concentration de bactérie d'intérêt et une forte concentration de la flore commensale. Nous avons utilisé 7 espèces bactériennes différentes lors de nos essais notamment des bactéries commensales de la peau et des bactéries retrouvées dans les selles.

Pour ce faire, un standard McFarland 0,5 (Thermo Scientific, Ottawa, ON, Canada ), correspondant à environ  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL, a été dilué et ensemencé sur gélose au sang de mouton (Oxoid). Les dilutions effectuées à partir du McFarland 0,5 sont : deux dilutions 1:100 suivi d'une dilution 1:10 dans de la saline 0,9% à 4°C. Nous avons ensuite déposé 100 µL, 40 µL et 10 µL de bactéries sur des géloses et patiné les géloses avec une pipette Pasteur repliée en forme de L. Concernant *P. aeruginosa*, une quatrième dilution (FD 1 :10) a été réalisée afin d'avoir une concentration de  $1-2 \times 10^2$  UFC/mL et deux autres volumes (40µL et 10µL) ont été déposés sur une gélose au sang. Après une incubation de 20 h à 35°C, les colonies poussant sur les géloses au sang de mouton ont été dénombrées. Les résultats de cette phase préliminaire sont présentés dans la section RÉSULTATS.

Afin de permettre aux bactéries à l'étude de croître de manière concomitante, il est fondamental de créer un milieu de culture qui enrichit les bactéries recherchées et qui inhibe la croissance des autres bactéries nuisibles. Pour ce faire, nous avons utilisé le bouillon



d'enrichissement développé par Frost et Deslandes, et dont nous avons modifié la composition.

### ***3.1.2 Préparation du bouillon d'enrichissement***

Plusieurs essais ont été faits afin de déterminer la concentration optimale d'antibiotiques pour la croissance des bactéries *S. aureus* et *E. faecium*, *E. faecalis* à partir du bouillon de d'enrichissement de référence.

– *Composition du bouillon d'enrichissement sans antibiotique (bouillon neutre)*

1,5 % (p/v) tryptose, 0,25 % (p/v) *Neutralized liver digest*, 0,5 % (p/v) extrait de levure, 25g/L chlorure de sodium, 1 % (p/v) mannitol.

– *Composition des bouillons avec antibiotiques*

À partir du bouillon d'enrichissement sans antibiotiques (bouillon neutre), nous avons choisi d'ajouter des antibiotiques spécifiques à différentes concentrations. Avec ces nouveaux bouillons, nous avons réalisé les essais *in vitro* suivants afin de déterminer la meilleure composition et concentration d'antibiotiques spécifiques.

*Premier essai :*

Concentration des différents antibiotiques et de chlorure de sodium (NaCl) ajoutée au bouillon neutre.

– *Composition des bouillons avec antibiotiques*

Mélange 0 : une concentration de 2µg/ml Tazocin (TZP) (Sandoz Canada Inc, Boucherville, Qc, Canada) + [25g/L] NaCl.

Mélange 1 : [2µg/ml] Céfotaxime (CTX) (Sanofi Aventis Canada, Laval, Qc, Canada) + [32µg/ml] Aztréonam (ATM) (Bristol-Myers Squibb Canada, Saint-Laurent, Qc, Canada) + [25g/L] NaCl.

Mélange 2 : [2µg/ml] CTX + [25g/L] NaCl

Mélange 3 (bouillon neutre) : [25g/L] NaCl

Mélange 4 : [65g/L] NaCl

Nous avons inoculé les bouillons avec une concentration bactérienne de 40 UFC/mL de nos bactéries d'intérêt et une concentration de 40 000 UFC/mL des bactéries présentes dans les selles, dans un volume de 2 mL. Afin d'assurer la reproductivité des essais, nous avons préalablement congelé les dilutions dans du glycérol 80 % et effectué un contrôle de croissance des bactéries à chaque essai ; ceci dans le but de confirmer la survie des cellules préalablement congelées. Le tableau 2 représente la distribution des dilutions bactériennes et les concentrations d'antibiotique dans les tubes des cinq mélanges.

**Tableau 3 : Distribution des dilutions bactériennes et concentrations antibiotiques dans 2ml de bouillon**

	Tubes	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>
<b>Mélange 0</b>	0-1	4 µl de [10 <sup>4</sup> ]	-	-	-	-	-
<b>Piptazo</b>	0-2	-	4 µl de [10 <sup>4</sup> ]	-	-	-	-
	0-3	-	-	4 µl de [10 <sup>4</sup> ]	-	-	-
	0-4	4 µl de [10 <sup>4</sup> ]	4 µl de [10 <sup>4</sup> ]	4 µl de [10 <sup>4</sup> ]	4 µl de [10 <sup>4</sup> ]	4 µl de [10 <sup>4</sup> ]	4 µl de [10 <sup>4</sup> ]
	0-5	4 µl de [10 <sup>4</sup> ]	4 µl de [10 <sup>4</sup> ]	4 µl de [10 <sup>4</sup> ]	40 µl de [10 <sup>6</sup> ]	40 µl de [10 <sup>6</sup> ]	40 µl de [10 <sup>6</sup> ]

Distribution des différentes espèces bactériennes dans le bouillon TZP et dilutions des standards McFarland 0,5 dans la saline (4µL x 10<sup>4</sup> UFC/mL). Pour la condition 0-5, il y a un rapport de 1000 entre les bactéries d'intérêt et les bactéries non recherchées.

Après l'incubation des bouillons (16 h et 18 h à 35°C sous agitation; 300 rpm), nous avons mesuré les densités optique (D.O.) et procédé à une série de dilutions afin d'obtenir une concentration de 1x10<sup>-3</sup>, 1x10<sup>-4</sup> et 1x10<sup>-6</sup> UFC/mL. Les dilutions ont été réalisées avec de la saline 0,9% à 4°C et sur glace. Chaque dilution a été ensemencée avec 10 µL et 100 µL de bouillon sur une gélose au sang. Après l'incubation des géloses (18 h à 35°C), nous avons procédé au décompte des colonies présentes sur les géloses.

**Tableau 4 : Exemples de dilutions déposées sur géloses pour le décompte bactérien**

TUBES	DILUTIONS	QUANTITÉ DÉPOSÉ SUR LA GÉLOSE	GÉLOSES
<b>1-1</b>	Pur	10µL	Sang
	1 x 10 <sup>-3</sup> /mL	100µL	Sang
	1 x 10 <sup>-6</sup> /mL	100µL	Sang
<b>1-5</b>	Pur	10µL	Sang
	1 x 10 <sup>-3</sup> /mL	100µL	Sang
	1 x 10 <sup>-4</sup> /mL	100µL	Sang
	Pur	10µL	MacConkey
	1 x 10 <sup>-3</sup> /mL	100µL	MacConkey
	1 x 10 <sup>-4</sup> /mL	100µL	MacConkey

Pur : bouillon après l'incubation sans dilution. 1 x 10<sup>-3</sup>/mL : une dilution 1 :1000 à partir du bouillon pur, 1 x 10<sup>-4</sup>/ml : deux dilutions sériées de 1 :1000 suivi de 1 :10 à partir du bouillon pur.

### *Deuxième essai*

Dans l'article écrit par Böcher *et al.* en 2008, les auteurs montrent que la spécificité du test est améliorée lorsque la concentration de l'aztréonam est diminuée à 20 µg/mL. Après lecture de cet article, d'autres essais sur les concentrations des antibiotiques ont été réalisés.

– *Composition de ces nouveaux bouillons.*

Mélange 0 : une concentration de 2µg/ml TZP + [25g/L] NaCl.

Mélange 1B: [2µg/ml] CTX + [20µg/ml] ATM + [25g/L] NaCl.

Mélange 1C: [2µg/ml] CTX + [15µg/ml] ATM + [25g/L] NaCl.

Mélange 1D: [2µg/ml] CTX + [10µg/ml] ATM + [25g/L] NaCl.

Mélange 2: [2µg/ml] CTX+ [25g/L] NaCl

Mélange 2B : [4µg/ml] CTX + [25g/L] NaCl

En effectuant les expériences décrites plus haut, nous avons réalisé cette deuxième série d'essai en remplaçant les bactéries *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* et *E. coli* par une suspension de selles préparée telle que décrite dans l'article d'Apajalahti *et al.*, en 1998 (*Applied And Environmental Microbiology*). L'essai a été réalisé en utilisant 5 µL d'une suspension 1:10 de selles ajoutées à 40 UFC/mL (4µL x 10<sup>4</sup>UFC/mL) de SARM et d'ERV dans nos bouillons d'enrichissement. Nous avons placé les tubes à 35°C *overnight*, sans agitation.

Le tableau 5 présente la distribution des bactéries étudiées et celles de la suspension de selles dans les différentes conditions.

**Tableau 5 : Distribution des bactéries selon les conditions**

	Tubes	SARM	ERV	Selle 1	Selle 2	Selle 3
<b>Mélange 0</b>	0-1	4 µl de $10^4$	-	-	-	-
<b>Piptazo</b>	0-2	-	4 µl de $10^4$	-	-	-
	0-3	-	-	5 µL de [1/10]	-	-
	0-4	-	-	-	5 µL de [1/10]	-
	0-5	-	-	-	-	5 µL de [1/10]
	0-6	4 µl de $10^4$	4 µl de $10^4$	-	-	-
	0-7	4 µl de $10^4$	-	5 µL de [1/10]	-	-
	0-8	-	4 µl de $10^4$	5 µL de [1/10]	-	-
	0-9	4 µl de $10^4$	4 µl de $10^4$	5 µL de [1/10]	-	-
	0-10	4 µl de $10^4$	-	-	5 µL de [1/10]	-
	0-11	-	4 µl de $10^4$	-	5 µL de [1/10]	-
	0-12	4 µl de $10^4$	4 µl de $10^4$	-	5 µL de [1/10]	-
	0-13	4 µl de $10^4$	-	-	-	5 µL de [1/10]
	0-14	-	4 µl de $10^4$	-	-	5 µL de [1/10]
	0-15	4µl x $10^4$	4 µl de $10^4$	-	-	5 µL de [1/10]

Les tubes ont été placés à l'étuve à 35°C pour une période de 18 à 24 h. Pour le dénombrement des colonies, 4 µL d'une dilution  $1 \times 10^{-4}$  UFC/mL ont été déposés et étalés sur géloses au sang de mouton. Les dilutions bactériennes ont été conservées dans du glycérol 80% et mis à -70°C. Selles : 5µL d'une suspension 1 :10 a été déposée dans les tubes.

Les dilutions bactériennes ont été conservées dans du glycérol 80% et mis à -70°C.

Pour obtenir la concentration finale de 40 UFC/ml :

- Une dilution de 1 :100 et de 1 :40 ont été réalisées dans la saline 0,9% à 4°C, à partir d'un McFarland 0,5.
- Concentration finale de  $2,5 \times 10^4$  UFC/ml
- 400µL de se bouillon a été ajouté à 600µl de glycérol 80% et congelé à -70°C.

Pour obtenir une concentration finale de 4000 UFC/ml dans les bouillons :

- Une dilution de 1 :40 a été réalisée dans la saline 0,9% à 4°C, à partir d'un McFarland 0,5.
- Concentration finale de  $2,5 \times 10^4$  UFC/ml.
- 400µL de se bouillon a été ajouté à 600µl de glycérol 80% et congelé à -70°C

Les bactéries SARM et ERV du deuxième essai ont été détectées par PCR en temps réel. Les détails de l'analyse PCR sont décrits à la section 3.2.1.

## 3.2 Détection par PCR

### 3.2.1 Extraction et PCR de référence

Les méthodes de référence pour l'extraction de l'ADN et pour la PCR sont issues des travaux de développement de Frost et Deslandes.

#### 3.2.1.1 Méthode d'extraction de l'ADN

Voici les étapes pour procéder à l'extraction de l'ADN à partir du bouillon d'enrichissement : Nous avons prélevé 200 µL de bouillon, centrifugé des 200 µL à 10 000 rpm pendant 5 min, retiré le surnageant et ajouté du liquide d'extraction (500 µl) (NaOH 1M + EtOH 70 %), incubation à 70°C pendant 10 min. Nous avons poursuivi avec la seconde centrifugation 10 min à 10 000 rpm, le retrait du surnageant et l'ajout du produit de solubilisation de l'ADN (100 µl), une solution de Triton-Tween (Triton-X-100 et 0.5 % Tween-20).

#### 3.2.1.2 Méthode PCR de référence (Frost et Deslandes)

##### Milieus réactionnels :

Nous avons utilisé 15 µL final de milieu réactionnel (*MasterMix*) pour la détection des gènes *nuc* et *mecA*, *vanA* et *vanB* et l'ARN ribosomique 16S d'*E. faecium* et d'*E. faecalis*. Le *MasterMix* contient du mix LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics) à une concentration 1x (dNTP, dUTP, FastStart TaqPolymérase™, MgCl<sub>2</sub>, SYBR Green I dye.), 0,5 µM de l'amorce sens (EF nuc 286F), 0,5 µM de l'amorce anti-sens (EF nuc 564R) pour faire la détection du gène *nuc*, 1 µL d'ADN extrait du bouillon à analyser le tout complété avec de l'eau PCR-Grade<sup>14</sup> qsp 15 µL.

Chaque *MasterMix* a été réalisé de la même façon avec les amorces appropriées pour chacun des gènes ciblés.

**Tableau 6 : Liste des amorces utilisées**

AMORCES	CIBLES	SÉQUENCE (5'-3')
EF nuc 286F	<i>Nuc</i>	5'-GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT-3'
EF nuc 564R	<i>Nuc</i>	5'-AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC-3'
MecA 1596F	<i>mecA</i>	5'-CTA GGT GTT GGT GAA GAT ATA CCA-3'
MecA 1783R	<i>mecA</i>	5'-TGA GGT GCG TTA ATA TTG CCA-3'
er VanA R	<i>vanA</i>	5'-CGA TTC AAT TGC GTA GTC CAA-3'
er VanB R	<i>vanB</i>	5'-GCC GAC AAT CAA ATC ATC CTC-3'
er VanAB F	<i>vanA / vanB</i>	5'-GTA GGC TGC GAT ATT CAA AGC-3'
Entco 45 F	<i>E.fæcium/fæcalis</i>	5'-ACA TGC AAG TCG AAC GCT TCT-3'
Entco 237 R	<i>E.fæcium/fæcalis</i>	5'-CAT CAG CGA CAC CCG AAA GC-3'

### La détection par PCR

Les spécimens ont été soumis à la détection des gènes *nuc*, *mecA*, *vanA*, *vanB* et la sous-unité 16s de l'ARN ribosomique des *E. fæcium* et *E. fæcalis*, avec les conditions PCR décrites dans l'encadré.

Conditions de la PCR : effectuée avec le thermocycleur LightCycler 480 II real-time PCR system de la compagnie Roche Diagnostics.

95°C [05 :00 min]

40 cycles (95°C [0 :10 min], 55°C [0 :40 min], 72°C [0:15 min])

95°C [01:00 min] (obtention de la courbe de dénaturation (T<sub>m</sub>))

60°C [1:00 min]

60°C à 90°C (à raison de 0,11°C/sec avec 5 acquisitions/°C)

40°C [0 :10 min]

### Critères de positivité :

Dans le cas des spécimens connus SARM, pour définir si un bouillon est positif celui-ci doit avoir une valeur de Ct inférieure ou égale à 28 cycles et une valeur de TM appropriée pour le gène *nuc* et pour le gène *mecA*. ( $\pm 1,5^{\circ}\text{C}$  du contrôle positif) soit environ  $77,5^{\circ}\text{C}$  pour le gène *nuc* et environ  $76,5^{\circ}\text{C}$  pour le gène *mecA*. La hauteur des pics de fluorescence doit correspondre à 25% de la valeur du contrôle journalier. Les bouillons ayant les qualificatifs précédents ont été ensemencés sur des géloses au sang de mouton (GS) et sur des géloses *Mannitol salt* (Man) en utilisant un fil calibré de 1  $\mu\text{L}$  et incubés 18 à 24 h à  $35^{\circ}\text{C}$  à l'air ambiante ( $\text{O}_2$ ).

Faire la recherche de colonies blanches ( $\beta$ -hémolyse) et faire les tests suivants :

- Test d'agglutination : ex. : Pastorex : positif
- Test de la catalase : positif
- Coloration de Gram : Cocci Gram + disposés en amas

Faire la recherche de colonies grises typique de l'entérocoque et faire les tests suivants :

- Test de la catalase : négatif
- Test de Pyr (Remel) : Pyr +
- Coloration de Gram : Cocci Gram+ disposés en chaîne



### 3.2.2 *Élaboration de la PCR multiplexe en temps réel*

Le projet de recherche comprenait le développement d'un multiplexe PCR en temps réel pour la détection du SARM et de l'ERV.

La première étape consistait à faire la sélection des amorces et des sondes nécessaires à la détection de nos souches de SARM et d'ERV. Pour ce faire, nous avons procédé à l'alignement des séquences d'ADN des gènes d'intérêts en utilisant le logiciel *ClustalW Multiple Alignment du logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor* (version 7.0.5.3).

Pour le choix des amorces et sondes SARM nous avons sélectionné plusieurs séquences du gène *mecA* et deux séquences du gène *mecC*, plusieurs séquences des gènes pour la thermonucléase (*nuc*) et nous avons sélectionné et aligné plusieurs gènes *vanA* et *vanB* pour la sélection des amorces et sondes ERV. Les séquences d'ADN se retrouvent dans la base de données d'NCBI; *The National Center for Biotechnology Information*. En comparant les différentes séquences, il est possible de voir les mésappariements entre les nucléotides des souches sélectionnées. Le design des amorces et des sondes est possible grâce au module *OligoAnalyzer* (version 3.1) du logiciel en ligne IDT SciTools, et grâce au logiciel en ligne DINAMelt; *DI-Nucleic Acid hybridization and melting prediction* (version 3.6). En utilisant ces logiciels nous avons étudié les comportements des oligonucléotides sélectionnés (IDT) (sondes et amorces) en regardant la température d'hybridation ( $T_M$  ( $^{\circ}\text{C}$ )), c'est-à-dire la température à laquelle l'oligonucléotide s'hybride avec la cible, si l'oligonucléotide se replie en épingle à cheveux (Hairpin ( $^{\circ}\text{C}$ )), sa fonction d'enthalpie libre  $G$  (l'énergie de Gibbs :  $\Delta G$  (kCal/Mole)), si l'oligonucléotide s'hybride avec elle-même (HomoDimer ( $^{\circ}\text{C}$ )) ou avec d'autres oligonucléotides et/ou amplicons présents dans la réaction PCR (HeteroDimer ( $^{\circ}\text{C}$ )). Et finalement, afin de s'assurer de la spécificité des différentes amorces et sondes, leurs séquences ont été comparées à celles contenues dans la base de données d'NCBI à l'aide du logiciel en ligne de *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Altschul *et al.*, 1990).

Les tableaux suivant énumèrent les amorces, les sondes, ainsi que les autres oligonucléotides synthétisés utilisés dans les expériences décrites subséquemment et visant la détection du gène de la thermonucléase (*nuc*), séquence propre à la bactérie *S. aureus* (SASM), le gène de résistances à la méticilline (*mecA* et *mecC*) chez les SARM et le gène de la *Penton Valentine*

*Leukocidin (PVL)* retrouvé chez les souches de SARM acquise en communauté (SARM-AC). Les tableaux présentent également les séquences permettant la détection du gène de l'ARN ribosomique 16S dans les spécimens de *E. faecium* et *E. faecalis* (ESV), dans les spécimens d'entérocoques autres que *E. faecium* et *E. faecalis* (*E.sp*), ainsi que la détection de résistances à la vancomycine (*vanA* et *vanB*) chez les bactéries ERV.

La figure suivante représente la marche à suivre jusqu'à la sélection des meilleurs oligonucléotides.

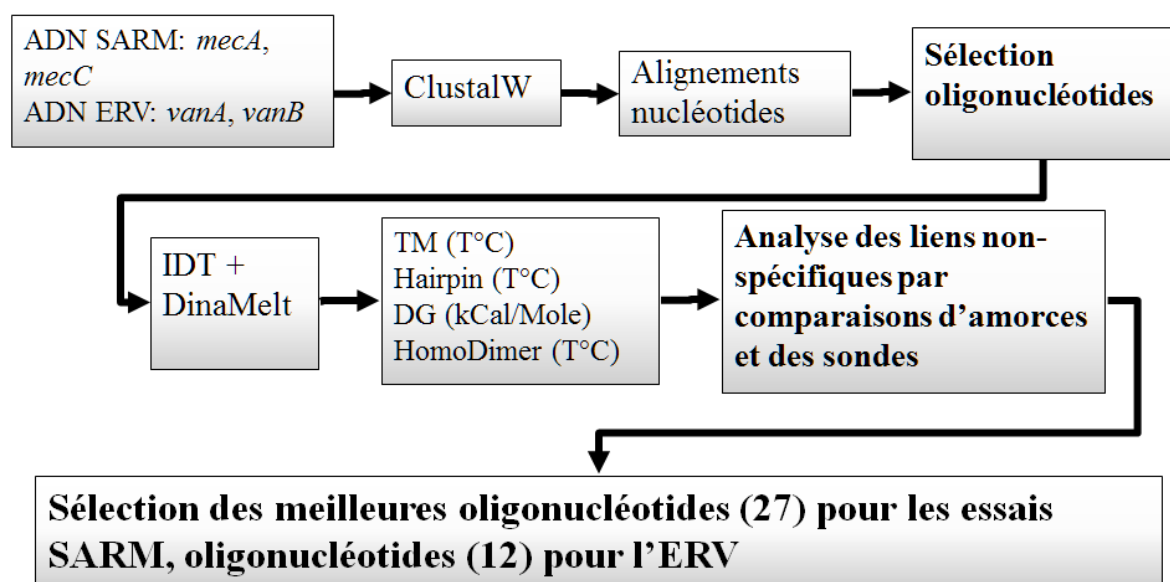


Figure 13 : Synthèse pour la conception des amorces et des sondes

Le tableau 7 dresse la liste des différentes amorces utilisé lors du projet de recherche pour le SARM.

**Tableau 7 : Liste des amorces utilisées lors du projet pour le *S. aureus***

AMORCES		CIBLES	SÉQUENCES
EF Nuc 286F	<i>nuc</i>	SASM	5'-GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT-3'
EF Nuc 286aF	<i>nuc</i>	SASM	5'-GCG ATT GAT GGT GAT ACT GTT-3'
EF Nuc 564R	<i>nuc</i>	SASM	5'-AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC-3'
IDT nuc 41F	<i>nuc</i>	SASM	5'-TYG TTT CAA TAT TAC TTA TAG GGA TGG C-3'
IDT nuc 170R	<i>nuc</i>	SASM	5'-GAG CTA CTT AGA CTT GAA RCT ACA AC-3'
IDT nuc 355F	<i>nuc</i>	SASM	5'-GAT ACA CCT GAA ACA AAG CAT CC-3'
IDT nuc 501R	<i>nuc</i>	SASM	5'-GCC ACG TCC ATA TTT ATC AGT TC-3'
BPnuc_F	<i>nuc</i>	SASM	5'-CAT CCT AAA AAA GGT GTA GAG A-3'
BPnuc_R	<i>nuc</i>	SASM	5'-TTC AAT TTT MTT TGC ATT TTC TAC CA-3'
MecA 1596F	<i>mecA</i>	SARM	5'-CTA GGT GTT GGT GAA GAT ATA CCA-3'
MecA 1783R	<i>mecA</i>	SARM	5'-TGA GGT GCG TTA ATA TTG CCA-3'
GarciaMecA F	<i>mecA</i>	SARM	5'-TCA CCA GGT TCA ACY CAA AA-3'
GarciaMecA R	<i>mecA</i>	SARM	5'-CCT GAA TCW GCT AAT AAT ATT T-3'C
1331 a F	<i>mecA</i>	SARM	5'-ACA ACT TCA CCA GGT TCA AC-3'
1331 b F	<i>mecA</i>	SARM	5'-ACT ACA TCA CCA GGT TCA AC-3'
1527 R	<i>mecA</i>	SARM	5'-GTT RTC TGA TGA TTC TAT TGC TTG-3'
EBmecA 1528R	<i>mecA</i>	SARM	5'-TCT GAT GAT TCT ATT GCT TG-3'
IDT sccX 568F	<i>mecA</i>	SARM	5'-GAC CGA AAC AAT GTG GAA TTG G-3'
IDT sccX 705R	<i>mecA</i>	SARM	5'-CAT TTG TTG TTT GAT ATA GTC TTC AGA AAT-3'
IDT sccX 1902F	<i>mecA</i>	SARM	5'-TGC AGA ACT CAA AAT GAA ACA AGG-3'
IDT sccX 2051R	<i>mecA</i>	SARM	5'-CCT GAG ATT TTG GCA TTG TAG C-3'
IDT sccXI 1776F	<i>mecC</i>	SARM	5'-TGG TAA ATC TGG CAC AGC A-3'
IDT sccXI 1940R	<i>mecC</i>	SARM	5'-GGC CAT CCC TTT ATT TTG AAC G-3'
BPmecAx_F	<i>mecA</i>	SARM	5'-GGC AAT ATT AMC GCA CCT CA-3'
BPmecAx_R	<i>mecA</i>	SARM	5'-GTC TGC CAS TTT CTC CTT GT-3'
BPmecAxi_F	<i>mecC</i>	SARM	5'-AGA TTT AAA GTA GTA GAC GGC A-3'
BPmecAxi_R	<i>mecC</i>	SARM	5'-TTT CAC CGA TTC CCA AAT CT-3'
BP PVL1_F	<i>PVL</i>	SARM-AC	5'-ACC CCC ATT AGT ACA CAG TG-3'
BP PVL1_R	<i>PVL</i>	SARM-AC	5'-CTT CTA GTA GCA TGA GTA ACA TC -3'

EF : Oligonucléotides conçu par Frost, IDT : conçu par le logiciel IDT, BP : provenant article (Pichon *et al.*, 2012). Garcia : issu de l'article (Garcia *et al.*, 2011)

Le tableau 8 dresse la liste des différentes amorces utilisé lors du projet de recherche pour l'ERV.

**Tableau 8 : Liste des amorces utilisées lors du projet pour les Entérocoques**

AMORCES		CIBLES	SÉQUENCES
<b>Entco 45F</b>	<i>16S</i>	ESV	5'-ACA TGC AAG TCG AAC GCT TCT-3'
<b>Entco 237R</b>	<i>16S</i>	ESV	5'-CAT CAG CGA CAC CCG AAA GC-3'
<b>Entco 1111F</b>	<i>16S</i>	E.sp	5'-CAA CGA GCG CAA CCC TTA TTG-3'
<b>Entco 1123F</b>	<i>16S</i>	E.sp	5'-CCC TTA TTG TTA GTT GCC ATC ATT-3'
<b>Entco 1120F</b>	<i>16S</i>	E.sp	5'-CAA CCT TAT TGT TAG TTG CCA TC-3'
<b>Entco 1265R</b>	<i>16S</i>	E.sp	5'-ACT CGT TGT ACT TCC CAT TGT-3'
<b>Entco 1268R</b>	<i>16S</i>	E.sp	5'-GCR ACT CGT TGT ACT TCC CA-3'
<b>er Van AB F</b>	<i>vanAB</i>	ERV	5'-GTA GGC TGC GAT ATT CAA AGC-3'
<b>er Van ABa F</b>	<i>vanAB</i>	ERV	5'-GTG GGC TGT GAT ATT CAA AGC-3'
<b>er Van A R</b>	<i>vanAB</i>	ERV	5'-CGA TTC AAT TGC GTA GTC CAA-3'
<b>er Van B R</b>	<i>vanAB</i>	ERV	5'-GCC GAC AAT CAA ATC ATC CTC-3'
<b>er Van AB R</b>	<i>vanAB</i>	ERV	5'-CGA CCT CAC AGC CCG AA-3'

Entco (Entérocoque *fæcium/fæcalis*) VanAB (amorce permettant la détection des gènes *vanA* et *vanB*) E.sp (différentes espèces d'entérocoques)

**Tableau 9 : Liste des sondes utilisées lors du projet (SARM et ERV)**

SONDES		CIBLES	SÉQUENCES
<b>EF Nuc 389F</b>	<i>nuc</i>	SASM	5'-6~FAM-ATG GTC CTG AAG CAA GTG CAT TTA CG-Q-3'
<b>EF MecA 1448R</b>	<i>mecAC</i>	SARM	5'-6~FAM-ATG CAT CTT TTT GCC AAC CCT TAC CAT CGA T-Q-3'
<b>EF MecA 1456R</b>	<i>mecAC</i>	SARM	5'-HEX-ACC CCA TGA TTT ATC TTT TTG CCA ACC TTT ACC-3IABkFQ-3'
<b>mecAC 1926F</b>	<i>mecAC</i>	SARM	5'-HEX-AGA AAC TGG AAG ACA AAT TGG GTG GT-Q-3'
<b>VanA 521F</b>	<i>vanA</i>	ERV	5'-HEX-TTC AGG CTC ATC CTT CGG TGT GAA AA-3'
<b>VanB 567R</b>	<i>vanB</i>	ERV	5'-FAM-TTC TTC CGT ACC GTT TAC TTT GGT TAC GC-3'

EF (Eric Frost); mecAC (sonde permettant la détection des gènes *mecA* et *mecC*)

Le tableau suivant dresse la liste des oligonucléotides qui ont servi de cible et d'amorce pour lors de la mise au point de la PCR multiplex. Les cibles 1448 STD et 1448 LGA 251 ont eu pour effet de mimer les souches SARM de la cassette SCC X (*mecA*) et SCC XI (*mecC*) lors des essais des sondes et amorces. Par la suite, nous avons eu la possibilité d'obtenir la nouvelle souche SCC IX (*mecC*) grâce à notre collaboration avec Simon Lévesque de l'INSPQ. Concernant les six oligonucléotides suivants dans la liste, il s'agit des amorces qui vont nous permettre de produire les contrôles internes. (Voir la section PERSPECTIVES)

**Tableau 10 : Liste des oligonucléotides synthétiques utilisés lors du projet**

OLIGONUCLÉOTIDES SYNTHÉTIQUES		CIBLES	SÉQUENCES
<b>Cible 1448STD</b>	<i>mecA</i>	SARM	5'-TTA TAA AAT CGA TGG TAA AGG TTG GCA AAA AGA TAA ATC TTG GGG TGG TTA CAA CAA-3'
<b>Cible 1448 LGA 251</b>	<i>mecC</i> SCCXI	SARM	5'-TTT TGA TAT TTA TGG TAA GGG TTG GCA AAA AGA TGC ATC ATG GGG TAA TTA TAA TAA-3'
<b>SCCXI PP7 F</b>	<i>mecC-PP7</i>	CTRL.I-SARM	5'-TGG TAA ATC TGG CAC AGC AGA ACT TAA CAT GCT G-3'
<b>SCCXI PP7 R</b>	<i>mecC-PP7</i>	CTRL.I-SARM	5'-GGC CAT CCC TTT ATT TTG AAC GCG CTA GAC AGA TCT ATC-3'
<b>vanAB PP7 F</b>	<i>vanAB-PP7</i>	CTRL.I-ERV	5'-GTA GGC TGC GAT ATT CAA AGC GAA CTT AAC ATG CTG-3'
<b>vanAB PP7 R</b>	<i>vanAB-PP7</i>	CTRL.I-ERV	5'-CGA CCT CAC AGC CCG AAC GCT AGA CAG ATC TAT C-3'
<b>Nuc355F_PP7 F</b>	<i>nuc-PP7</i>	CTRL.I-SASM	5'-GAT ACA CCT GAA ACA AAG CAT CCG AAC TTA ACA TGC TG-3'
<b>Nuc501R_PP7 R</b>	<i>nuc-PP7</i>	CTRL.I-SASM	5'-GCC ACG TCC ATA TTT ATC AGT TCC GCT AGA CAG ATC TAT C-3'

### 3.2.1 Détection du SARM et de l'ERV par méthode PCR

#### 3.2.1.2 Évaluation des oligonucléotides sélectionnés

La première étape était de comparer toutes les amorces sens (F : *Forward*) et anti-sens (R : *Reverse*) conçues précédemment, afin de trouver la meilleure combinaison pour une détection optimale de nos gènes. Nous avons basé notre analyse sur les valeurs de CP des souches utilisées lors des essais.

Une première série de 7 paires d'amorces Entérocoques ont été testée. Pour ce faire, nous avons utilisé 8 souches d'Entérocoques et un contrôle négatif (eau *PCR-grade*). Nous avons également utilisé le mix LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics) à une concentration 1x (dNTP, dUTP, FastStart TaqPolymérase™, MgCl<sub>2</sub>, SYBR Green I dye), 0,5 µM de chacune des amorces sens avec 0,5 µM les amorces anti-sens ainsi que 1µL d'extrait d'ADN de chaque souches (7) d'entérocoques et du contrôle négatif. Nous avons complété le master mix avec de l'eau PCR-Grade afin d'avoir un volume réactionnel final de 15 µl. L'extraction de l'ADN a été effectuée telle que décrit précédemment, à la section 3.3.6.4.

### 3.3 Validation du bouillon d'enrichissement

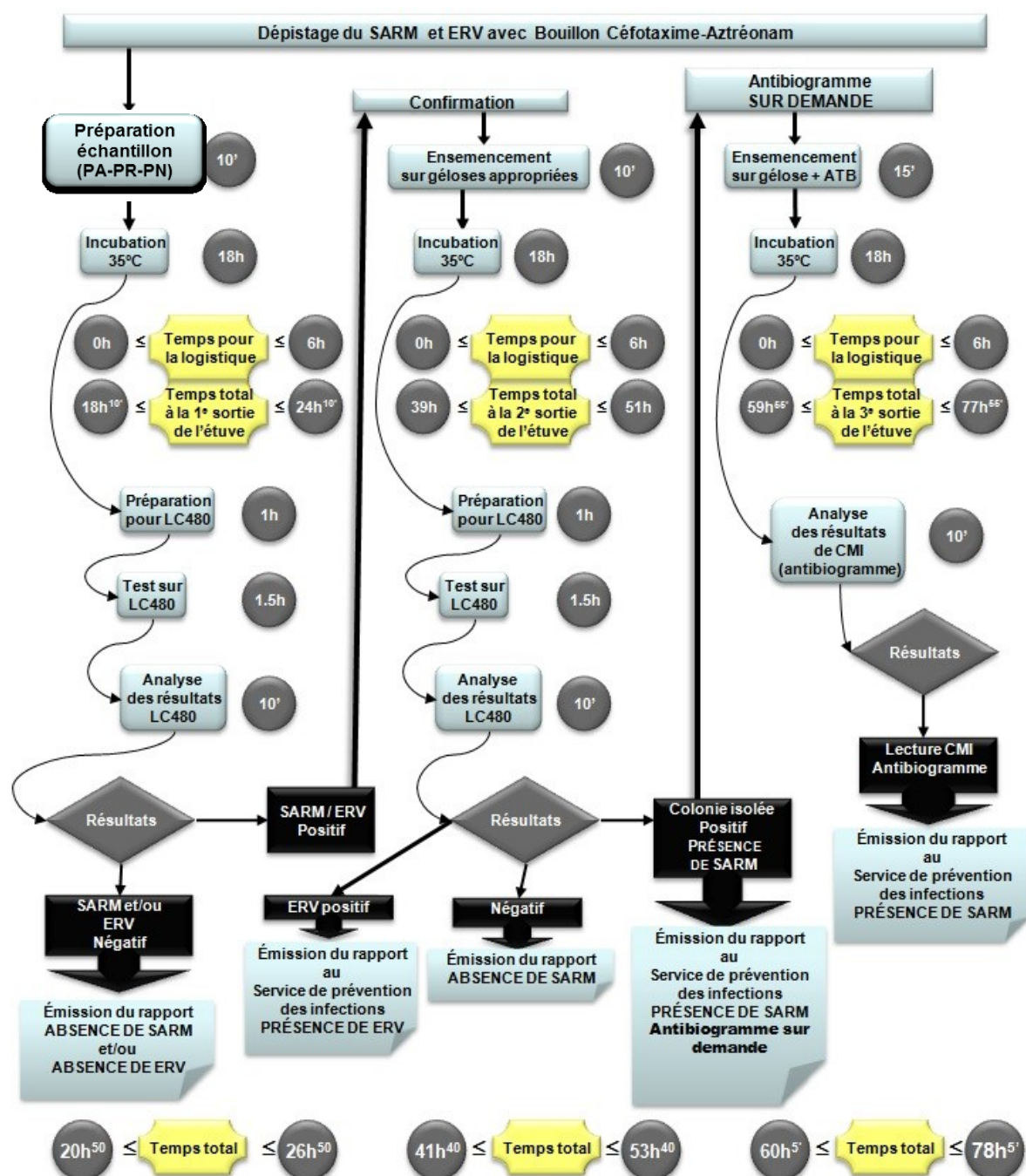
La validation du bouillon d'enrichissement était la première étape de mon projet de maîtrise qui vise la détection simultanée du SARM et de l'ERV grâce aux technologies de biologie moléculaire. La détection du SARM et de l'ERV a été réalisée de manière simultanée. Elle est plus rapide, sensible et spécifique ce qui permet à l'équipe de soins d'avoir un meilleur contrôle sur la propagation des maladies nosocomiales. Le nouveau bouillon permet également de réduire le temps d'isolement des patients qui sont dans l'attente du résultat de l'analyse.

Puisque l'on retrouve le SARM et l'ERV aux mêmes sites de prélèvement, nous avons envisagé l'utilisation d'un seul bouillon d'enrichissement pour les deux bactéries. Ceci permet une économie d'argent (achat d'un seul bouillon et surtout le coût relié au temps technique, etc.) et de temps d'exécution du test par le (la) technologiste médical(e). Avec un seul bouillon, nous faisons une seule extraction de l'ADN pour les deux analyses. De plus,

pour l'exécution de ces deux analyses, trois prélèvements sont nécessaires : un prélèvement nasal (PN), un prélèvement au pourtour de l'anوس (PA) et un prélèvement rectal (PR). Seulement deux prélèvements sont nécessaires grâce à ce nouveau bouillon d'enrichissement : Le prélèvement nasal (PN) et un prélèvement anus (PA) combiné avec un prélèvement rectal (PR).



Le schéma suivant représente le déroulement de l'analyse à partir de la réception du spécimen jusqu'à la sortie du rapport.



**Figure 14 : Schéma représentant l'exécution projetée du test de dépistage pour le SARM et l'ERV.**

Ensemencement du nouveau bouillon aztréonam (ATM) avec céfotaxime (CTX). PA : prélèvement anal, PR : Prélèvement rectal et PN : Prélèvement nasal



La validation du bouillon d'enrichissement a été exécutée après acceptation du projet par les comités d'éthique du CSSS Richelieu-Yamaska, CSSS-IUGS ainsi que le comité d'éthique du CRC-CHUS. Les certificats attestant l'acceptation du projet se retrouvent en annexe. Les formulaires de consentement (FIC) et les certificats d'autorisation sont disponibles en annexe.

### ***3.3.1 Population à l'étude et échantillon***

#### *– Population cible :*

Tous les patients dont le test de dépistage du SARM et/ou de l'ERV a été préalablement effectué au laboratoire de microbiologie clinique du CHUS ou des autres centres associés.

#### *– Population accessible :*

Patients admis au CHUS (site Fleurimont et Hôtel-Dieu), CSSS Richelieu-Yamaska (Hôpital Honoré-Mercier et site Hôtel-Dieu de St-Hyacinthe) et CSSS IUGS (Site Youville et site Argyll) dont un test de dépistage du SARM et/ou de l'ERV a été effectué.

#### *– Échantillon :*

Patients aptes à répondre au consentement, admis au CHUS ou aux autres centres associés, dont un test de dépistage du SARM et/ou de l'ERV a été effectué.

### ***3.3.2 Échantillonnage***

Étant donné que notre population devra contenir 50 spécimens SARM, 50 spécimens ERV et 100 spécimens négatifs (Clark et al., 2002), et que la prévalence de l'infection au CHUS est basse, nous avons fait une pré-sélection des participants. Nous avons eu accès à leur historique de dépistage afin d'obtenir un nombre satisfaisant de patients pour chaque analyse.

### **3.3.3 Critères d'inclusion et d'exclusion**

#### *– Premier critère*

Tous les patients aptes à signer un consentement éclairé ayant subi un test de dépistage SARM et/ou ERV lors de leur admission au centre hospitalier.

#### *Deuxième critère*

Le patient devra être encore hospitalisé au centre hospitalier lors du second prélèvement.

#### *– Troisième critère*

Le patient ne devait pas prendre d'antibiotiques au moment de l'étude. Cependant, ce troisième critère n'a pu être respecté due à la rareté des spécimens positifs et à l'importante utilisation des antibiotiques durant l'hospitalisation des bénéficiaires. Les antibiotiques ont été inscrits sur les FIC des participants. Ce biais sera tenu en compte lors de l'analyse des résultats.

### **3.3.4 Recrutement des sujets et prélèvements des échantillons**

En collaboration avec le service de Prévention et Contrôle des Infections (PCI) des différents centres et de notre infirmière associée : Mme France Marquette, nous avons sélectionné les patients colonisés par la bactérie SARM et/ou ERV qui étaient aptes à signer un consentement éclairé. La sélection du candidat a été effectuée en fonction des résultats obtenus et selon les critères d'inclusion/exclusion. Après avoir reçu les rapports d'analyse du SARM/ERV, au moment de l'admission du patient au centre hospitalier, l'infirmière du PCI du CHUS prenait contact avec le patient admissible à l'étude. Si le patient acceptait de participer au projet de recherche, l'infirmière du PCI remplissait le formulaire de consentement avec ce dernier et effectuait les prélèvements nécessaires à la validation soit le prélèvement au niveau du nez et un prélèvement anal suivi d'un prélèvement rectal (avec le même écouvillon) sur le patient.

Dans le cas des centres appartenant au CSSS Richelieu-Yamaska, l'étudiante à la maîtrise a rencontré les participants (liste fournie par les infirmières du PCI, toujours selon les résultats provenant du laboratoire). Notre infirmière associée au projet de recherche a effectué les prélèvements sur les patients participant au projet. Et finalement pour le CSSS IUGS, l'étudiante prenait directement contact avec les participants potentiels (listes fournis par les infirmières du PCI de l'IUGS) avant que l'infirmière ce celui-ci exécute les prélèvements requis. La personne responsable d'effectuer les prélèvements devait également encoder les spécimens prélevés au chevet du patient selon leur localisation (prélèvement nez ou anus/rectal) et inscrivait un numéro d'inclusion du patient dans l'étude (exemple : spécimen nez-1, anus-1).

Les patients dont le résultat était négatif à la détection du SARM et/ou à l'ERV ont été également approchés suivant les mêmes démarches.

Le seul inconvénient pour le patient a été la prise d'un second prélèvement nez-anus-rectum, durant son séjour au centre hospitalier, pouvant occasionner un certain inconfort. Aucun autre prélèvement n'a été fait dans le cadre de ce projet de recherche, aucune autre visite n'a été faite par le responsable.

L'étudiante à la maîtrise (et également technicienne en laboratoire médical) a effectué la seconde série d'analyses sur les nouveaux prélèvements. Elle a consulté les résultats initiaux seulement après avoir réalisé l'analyse de la seconde série d'échantillons. Ceci dans le but de faire une analyse à l'aveugle.

Lors du recrutement des participants, 99 patients ont accepté de participer à l'étude, 51 femmes et 48 hommes. Les participants provenaient des trois centres mentionnés précédemment selon les proportions suivantes : 48 patients provenant du CSSS Richelieu-Yamaska, 1 patient du CSSS-IUGS et 50 patients provenant du CHUS. 32 patients avaient une couverture antibiotique lors du prélèvement des spécimens, 59 patients n'avaient pas de couverture antibiotique et finalement, l'information n'était pas disponible chez 8 patients recrutés. (Voir la section ANNEXE I pour plus de détail.)

### 3.3.4 Variables et collecte des données

#### – Variables de l'étude

Capacité de croissance (variable dépendante) des bactéries SARM/ERV dans le bouillon expérimental (variable indépendante).

#### – Instrument de mesure

L'analyse des bouillons se fera grâce à la méthode PCR (LightCycler®480 de Roche Diagnostiques), méthode actuellement employée au sein du laboratoire de microbiologie clinique pour la détection du SARM. L'appareil permet l'amplification de l'ADN de la bactérie ainsi que la détection de cette dernière grâce à des amorces/sondes spécifiques à certains de ses gènes.

Les gènes amplifiés pour le SARM sont la thermonucléase (*nuc*) et le gène *mecA*, de la cassette staphylococcique (SCC X) tel qu'analysé au laboratoire de microbiologie clinique du CHUS. Les gènes amplifiés pour la détection de l'ERV sont le *vanA* et le *vanB* et pour l'ESV il s'agit de la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal d'*E. faecium* et *E. faecalis*. La méthode par PCR en temps réel permet une détection sensible et spécifique de la bactérie.

### 3.3.5 Déroulement de l'étude

#### – Au laboratoire clinique

Dépistage des bactéries d'intérêt, conforme aux pratiques actuellement en vigueur. Exécuté par le personnel du laboratoire clinique du centre hospitalier hébergeant le bénéficiaire.

#### – Rencontre avec le patient

Rencontre du patient à son chevet et signature du consentement.

Étape exécutée par l'infirmière du PCI ou l'étudiante.

Prélèvement d'un échantillon nasal et anal-rectal grâce à l'utilisation d'un écouvillon.  
Étape exécutée par l'infirmière du PCI ou l'infirmière associée.

Sur les spécimens prélevés seront inscrits l'heure, la date ainsi que le numéro de patient (arbitraire) et finalement s'il s'agit d'un prélèvement de nez (PN) ou prélèvement anal-rectal (PAR). Numéro attribué par le responsable du PCI et sera inscrit sur le formulaire de consentement.

– *Au laboratoire de recherche : approche étudiée*

Étape exécutée par l'étudiante à la maîtrise, technicienne diplômée en laboratoire médical.

24 spécimens de patients connus SARM +, 63 spécimens SARM -, 36 spécimens de patients connus ERV +, 37 spécimens ERV - et 36 spécimens de patients dont les résultats sont indéterminés au moment du recrutement des participants ont été prélevés. Suivant le protocole établi au laboratoire de microbiologie clinique du CHUS, les 99 spécimens (PN et PA-PR) ont été ensemencés dans 5 ml de bouillon sans antibiotiques, séparés en trois conditions différentes dans lesquelles les antibiotiques spécifiques ont été ajoutés à chacune des conditions pour reproduire les bouillons à l'étude :

- Bouillon de référence (2 ml avec 2 µg/ml de TZP),
- Nouveau bouillon à l'étude (2 ml avec 10 µg/ml ATM et 2 µg/ml CTX)
- Bouillon neutre sans antibiotique (1 ml de bouillon contrôle).
- Incubation des trois bouillons à 35°C sans agitation pendant 18 heures.

Après incubation *over night*, l'ADN des bouillons des trois conditions a été extrait selon la méthode en vigueur au laboratoire clinique (Voir section 3.2.1.1)

L'étape suivante consiste à la préparation du *MasterMix* : solution contenant tous les réactifs nécessaires à la détection des bactéries par PCR (détaillée à la section 3.1.2).

- 5) Prélever une colonie, mettre dans 100µl de saline 0,9% et procéder à l'extraction de l'ADN pour confirmation par PCR. (Tel que décrit à la section 3.2.6.4)

### ***3.3.6 Méthode de collecte des données***

L'étudiante inscrit l'information fournie par l'équipe de PCI dans un tableau de type Excel ainsi que les résultats obtenus lors de ses essais. L'étudiante compare les résultats seulement après que toutes les analyses soient complétées afin de ne pas influencer les résultats.

### ***3.3.7 Considérations éthiques***

En signant le consentement, le participant autorise l'équipe de recherche à prendre connaissance des résultats antérieurs dans son dossier médical, uniquement pour connaître les résultats du dépistage du SARM et de l'ERV (lors de sa présente admission à l'hôpital). Le participant autorise également l'équipe à réutiliser l'échantillon recueilli à des fins d'analyses subséquentes permettant d'améliorer la détection du SARM et de l'ERV. D'autres amorces et sondes seront testées sur les spécimens récoltés lors de l'étude ainsi qu'une nouvelle méthode d'extraction de l'ADN permettant à l'aboutissement souhaité par l'automatisation de cette méthode.

Les consentements signés seront conservés dans un tiroir verrouillé dans le bureau de l'étudiante à la maîtrise.

#### *– Les risques liés à l'étude*

Le participant n'est exposé à aucun risque en adhérant à l'étude.

Le participant possède une copie du consentement signé avec les numéros et adresse courriel permettant de communiquer avec le chercheur et/ou l'étudiante si nécessaire.

Le participant peut se retirer de l'étude en communiquant par écrit avec les responsables de l'étude.

#### *– Indemnisation*

Les patients n'ont reçu aucune indemnisation pour leur participation à l'étude.

### **3.3.8 Résultats de la validation des bouillons**

Les résultats des spécimens analysés par le laboratoire clinique et les résultats obtenus par l'étudiante seront compilés par celle-ci dans un tableau Excel. Seuls les numéros attribués au début de l'étude seront utilisés dans le fichier Excel, les noms des participants ne figurent pas dans le tableau des résultats. Les résultats et les spécimens d'ADN extraits seront conservés pour cinq ans.

## **3.4 Validation de la PCR en temps réel**

### **3.4.1 Validation de la PCR multiplexe en temps réel**

Pour répondre à l'objectif 4a, nous avons repris les spécimens de la validation du bouillon d'enrichissement, décrit aux sections 3.2.1.

#### *– Paramètres de la PCR multiplex en temps réel*

Voici les différents paramètres pour la nouvelle PCR multiplex pour le SARM et pour l'ERV.

Conditions de la PCR : effectuée avec le thermocycleur LightCycler 480 II real-time PCR system de la compagnie Roche Diagnostic.

95°C [05 :00 min]

40 cycles (95°C [0 :10 min], 55°C [0 :40 min], 72°C [0 :15 min])

95°C [00 :01 min] (obtention de la courbe de dénaturation (T<sub>m</sub>))

55°C [0 :30 min]

50°C [0 :30 min]

50°C à 85°C (à raison de 0,14°C/sec avec 2 acquisitions/°C)

40°C [0 :10 min]

– *Milieux réactionnels :*

Nous avons utilisé 15 µL final de milieu réactionnel (*MasterMix*) pour la détection des gènes *nuc*, *mecA* et *mecC*, *vanA* et *vanB*. Le *MasterMix* contient du mix LightCycler® 480 Probes Master (Roche Diagnostics) à une concentration 1x (dNTP, dUTP, FastStart DNA TaqPolymerase™, MgCl<sub>2</sub>), 1 µL d'ADN extrait du bouillon à analyser le tout complété avec de l'eau PCR-Grade qsp 15 µL. Pour les concentrations des amorces et des sondes, voir le tableau suivant.

**Tableau 11 : Liste des amorces et sondes utilisées dans la validation PCR et leur concentration**

<b>DÉTECTION DU SARM : GÈNES <i>NUC</i>, <i>MECA</i> ET <i>MECC</i></b>	<b>CONCENTRATION FINALE DES AMORCES ET DES SONDES</b>
Sonde F <i>mecAC</i> : 1926 F HEX	0,2 µM
Sonde F <i>nuc</i> : 389 F FAM	0,2 µM
Amorce F <i>mecA</i> : 1902 F	0,07 µM
Amorce R <i>mecA</i> : 2051 R	0,5 µM
Amorce F <i>mecC</i> : 1777 F	0,07 µM
Amorce R <i>mecC</i> : 1940 R	0,5 µM
Amorce F <i>nuc</i> : 355 F	0,07 µM
Amorce R <i>nuc</i> : 501 R	0,5 µM
<b>DÉTECTION DE L'ERV : GÈNES <i>VANA</i> ET <i>VANB</i></b>	<b>CONCENTRATION FINALE DES AMORCES ET DES SONDES</b>
Amorce F <i>vanAB</i>	0,25 µM
Amorce F <i>vanABa</i>	0,25 µM
Amorce R <i>vanAB</i>	0,5 µM
Sonde F <i>vanA</i> : 521 HEX	0,2 µM
Sonde R <i>vanB</i> : 567 FAM	0,2 µM

La séquence des amorces et des sondes est décrite aux tableaux 8 à 10.



## RÉSULTATS

### 4.1 Mise au point d'un bouillon d'enrichissement pour SARM et ERV

#### 4.1.1 Concentration bactérienne à utiliser lors des essais

L'exercice avait pour but de déterminer la concentration des bactéries qui sera ajoutée aux bouillons d'enrichissement lors des essais. Afin de tester les limites de notre bouillon, nous avons réduit au minimum le nombre de bactéries SARM et ERV dans les bouillons et augmenter le nombre des autres bactéries. Afin de confirmer le nombre de bactéries à partir d'un McFarland 0,5, plusieurs dilutions ont été réalisées (trois premières colonnes de droite). À partir de la dernière dilution ( $1-2 \times 10^3$  UFC/mL) trois volumes (100µL, 40µL et 10µL) ont été déposés sur une gélose au sang de mouton. Après une incubation à 35°C *overnight*, les colonies présentes ont été dénombrées nous indiquant que nous pourrions nous fier sur l'estimation du nombre de bactéries à partir d'un MacFarland 0,5. Inscrit dans la colonne « compté ». Concernant *P. aeruginosa*, une quatrième dilution (FD 1 :10) afin d'avoir une concentration de  $1-2 \times 10^2$  UFC/mL a été réalisée où deux autres volumes (40µL et 10µL) ont été déposés sur une gélose au sang.

**Tableau 12 : Détermination de la concentration bactérienne**

DILUTIONS/SALINE						100µL (DIXIÈME)		40µL (FD 1:25)		10µL (FD 1:100)		40µL (FD 1:25)		10µL (FD 1:100)	
	McFarland 0,5	100µL/10 mL	100µL/10 mL	100µL/1 mL	100µL/1mL	estimé	compté	estimé	compté	estimé	compté	estimé	compté	estimé	compté
<i>S. epidermidis</i>	1-2x10 <sup>8</sup> UFC/mL	FD 1:100 1-2 x10 <sup>6</sup>	FD 1:100 1-2 x10 <sup>4</sup>	FD 1:10 1-2 x10 <sup>3</sup>	-	100-200 UFC	115	40-80 UFC	33	10-20 UFC	14	-		-	
<i>S. spp</i>	10 <sup>8</sup> UFC/mL	FD 1:100 1-2 x10 <sup>6</sup>	FD 1:100 1-2 x10 <sup>4</sup>	FD 1:10 1-2 x10 <sup>3</sup>		100-200 UFC	58	40-80 UFC	15	10-20 UFC	2				
<i>P. aeruginosa</i>	10 <sup>8</sup> UFC/mL	FD 1:100 1-2 x10 <sup>6</sup>	FD 1:100 1-2 x10 <sup>4</sup>	FD 1:10 1-2 x10 <sup>3</sup>	FD 1:10 1-2 x10 <sup>2</sup>	100-200 UFC	~ 67	40-80 UFC	~ 15	10-20 UFC	4	4 UFC	1	1 UFC	0
<i>S. aureus</i>	10 <sup>8</sup> UFC/mL	FD 1:100 1-2 x10 <sup>6</sup>	FD 1:100 1-2 x10 <sup>4</sup>	FD 1:10 1-2 x10 <sup>3</sup>	-	100-200 UFC	112	40-80 UFC	41	10-20 UFC	8	-		-	
<i>E. faecalis</i>	10 <sup>8</sup> UFC/mL	FD 1:100 1-2 x10 <sup>6</sup>	FD 1:100 1-2 x10 <sup>4</sup>	FD 1:10 1-2 x10 <sup>3</sup>	-	100-200 UFC	96	40-80 UFC	25	10-20 UFC	10	-		-	
<i>P. mirabilis</i>	10 <sup>8</sup> UFC/mL	FD 1:100 1-2 x10 <sup>6</sup>	FD 1:100 1-2 x10 <sup>4</sup>	FD 1:10 1-2 x10 <sup>3</sup>	-	100-200 UFC	114	40-80 UFC	46	10-20 UFC	10	-		-	
<i>E. coli</i>	10 <sup>8</sup> UFC/mL	FD 1:100 1-2 x10 <sup>6</sup>	FD 1:100 1-2 x10 <sup>4</sup>	FD 1:10 1-2 x10 <sup>3</sup>	-	100-200 UFC	73	40-80 UFC	20	10-20 UFC	7	-		-	

FD (facteur de dilution), UFC (Unités formant des colonies). Pour chaque dilution, un nombre de colonies est estimé et un nombre de colonies a été compté.

Une concentration équivalente à 40 UFC/mL est ajoutée à 2mL de bouillon, ce qui correspond à 20 UFC/mL, soit 1µL x 10<sup>4</sup> UFC/mL.

#### 4.1.2 Essais sur les bouillons d'enrichissement

Premier essai :

**Tableau 13 : Résultats du premier essai : Évaluation de la concentration bactérienne dans les bouillons**

BOUILLONS D'ENRICHISSEMENT	TUBES	DILUTIONS UFC/mL	QUANTITÉ ENSEMENCÉ EN $\mu$ L	D.O. DU TUBE APRÈS INCUBATION*	COLONIES SUR GÉLOSE SANG
<b>MÉLANGE 0</b> <b>TZP 2<math>\mu</math>g/ml</b>	0-1	$1 \times 10^{-3}$	100	0,10	100
	<i>S. epidermidis</i>	$1 \times 10^{-6}$	100		2
	0-2 <i>S. aureus</i>	Pur	10	0,10	0
	0-3 <i>E. faecalis</i>	Pur	10	0	0
	0-4	Pur	10	0	>100 <i>S. epidermidis</i> 1 <i>S. aureus</i> >100 <i>E. faecalis</i>
	0-5			1,22*	
<b>MÉLANGE 1</b> <b>ATM 32<math>\mu</math>g/ml</b> <b>&amp; CTX 2<math>\mu</math>g/ml</b>	1-1 <i>S. epidermidis</i>	Pur	10	0,12	>100
		$1 \times 10^{-3}$	100		>100
		$1 \times 10^{-6}$	100		49
	1-2 <i>S. aureus</i>	Pur	10	0,01	0
	1-3 <i>E. faecalis</i>	$1 \times 10^{-10}$ /mL	100	0,15	1 <i>E. faecalis</i>
		$1 \times 10^{-12}$ /mL	100		0
	1-4	$1 \times 10^{-6}$ /mL	100	0,14	7 <i>S. aureus</i> 2 <i>E. faecalis</i>
		$1 \times 10^{-9}$ /mL	100		0
	1-5	Pur	10	0,15	>100
<b>MÉLANGE 2</b> <b>CTX 2<math>\mu</math>g/ml</b>		$1 \times 10^{-3}$	100		>100
		$1 \times 10^{-4}$	100		158
	2-1 <i>S. epidermidis</i>			0,16	
	2-2 <i>S. aureus</i>			0	
	2-3 <i>E. faecalis</i>			0,08	
<b>MÉLANGE 3</b> <b>25g/L NaCl</b>	2-4			0,98	
	2-5			1,45	
	3-1 <i>S. epidermidis</i>			0,12	
	3-2 <i>S. aureus</i>			1,19	
	3-3 <i>E. faecalis</i>			0,88	
<b>MÉLANGE 4</b> <b>65g/L NaCl</b>	3-4			1,61	
	3-5			1,65	
	4-1 <i>S. epidermidis</i>			0,37	
	4-2 <i>S. aureus</i>			1,30	
	4-3 <i>E. faecalis</i>			0,03	
	4-4			1,36	
	4-5			1,16	

\*Une turbidité de 0,08 représente un standard McFarland de 0,5. À partir des bouillons incubés (pur), une série de dilution a été effectuée afin d'être en mesure de faire le décompte des colonies présentes dans le bouillon. Décomptes a été fait sur géloses sang (GS).

Finalement, les tubes 2-1 à 2-5 ,3-1 à 3-5 et 4-1 à 4-5 n'ont pas été dilués et n'ont pas étéensemencé car nous doutions des résultats. Nous avons décidé de refaire l'analyse à partir de nouveaux tubes-mélanges. Cette fois-ci, au lieu de faire l'analyse des 25 tubes en même temps, un ou deux mélanges ont été analysés simultanément. De plus, les dilutions des bactéries ont été congelées à -70°C dans un mélange de glycérol 80%. Ce qui a réduit le temps technique et conservait une meilleure reproduction des essais.

Nous avons repris le premier essai pour les mélanges 0, 1, 2, 3 et 4. À partir du bouillon (pur) incubé 18-24hrs, nous avons pris la densité optique (D.O.) et nous avons fait plusieurs dilutions afin de faciliter le décompte des colonies sur géloses. Les dilutions ont été déposées sur géloses au sang. Le tableau 14 résume les résultats obtenus dans chacun des bouillons d'enrichissement.

**Tableau 14 : Synthèse des résultats obtenus lors de la reprise du premier essai**

BOUILLONS D'ENRICHISSEMENT	BACTÉRIES ENSEMENCÉES	BACTÉRIES RETROUVÉES DANS LE BOUILLON
<b>MÉLANGE 0</b>  TZP 2µg/ml	<i>S. epidermidis</i> ,  <i>S. aureus</i> ,  <i>E. faecalis</i> ,  <i>Ps. aeruginosa</i> ,  <i>E. coli</i>  et <i>P. mirabilis</i>	<i>E. faecalis</i> +++, <i>Ps. aeruginosa</i> ++, <i>E. coli</i> + et <i>P. mirabilis</i> +
<b>MÉLANGE 1</b> ATM 32µg/ml & CTX 2µg/ml		<i>E. faecalis</i> seulement +++
<b>MÉLANGE 2</b>  CTX 2µg/ml		<i>E. faecalis</i> +++, <i>Ps. aeruginosa</i> +++, et <i>P. mirabilis</i> +
<b>MÉLANGE 3</b>  25g/L NaCl		<i>S. epidermidis</i> ++, <i>S. aureus</i> +++, <i>E. faecalis</i> ++, <i>Ps. aeruginosa</i> ++, <i>E. coli</i> ++ et <i>P. mirabilis</i> ++
<b>MÉLANGE 4</b>  65g/L NaCl		<i>S. epidermidis</i> ++, <i>S. aureus</i> ++, <i>E. faecalis</i> ++, <i>Ps. aeruginosa</i> ++, <i>E. coli</i> ++ et <i>P. mirabilis</i> ++

Décompte à la dilution  $1 \times 10^{-6}$  UFC/mL : + entre 1 et 10 colonies, ++ entre 10 et 100 colonies, +++ >100 colonies. Les souches *S. aureus* et *S. epidermidis* sont sensibles aux antibiotiques utilisés dans les mélanges.

Dans le mélange 0 (bouillon de référence), nous retrouvons l'entérocoque, les entérobactéries (bacille Gram -) et le Pseudomonas (bacille Gram -) sur les géloses ensemencées. Le genre staphylocoque ne pousse pas puisque les souches utilisées sont sensibles au tazocin. Dans le mélange 1, seul l'entérocoque pousse sur la gélose car l'aztréonam (ATM) inhibe la croissance des bactéries Gram-. La céfotaxime (CTX) inhibe les staphylocoques sensibles à la méticilline. Nous retrouvons dans le mélange 2 l'entérocoque et les bacilles à Gram -. Finalement, les mélanges 3 et 4 permettent la croissance de toutes les bactéries utilisées lors de l'essai.

### *Deuxième essai : Analyse par PCR*

Après ces essais, nous avons fait plusieurs analyses de bouillons avec différentes combinaisons avec une souche de SARM, d'ERV et trois suspensions de selles à 10%. Voir tableau 4 dans la section MATÉRIELS ET MÉTHODES pour les détails relatifs aux essais.

**Tableau 15 : Résultats par PCR des bouillons avec les amorces SARM**

BOUILLONS D'ENRICHISSEMENT	SARM		SARM + SELLES		SARM +ERV- VANA + SELLES		CTRL-
	NUC/	MECA	NUC/	MECA	NUC/	MECA	
<b>MÉLANGE 0</b> TZP 2µg/ml	20,24	20,64	17,47	17,98	17,81	18,03	-
<b>MÉLANGE 1</b> ATM 32µg/ml & CTX 2µg/ml	20,99	23,68	20,32	21,71	20,75	22,02	-
<b>MÉLANGE 1B</b> ATM 20µg/ml & CTX 2µg/ml	21,70	23,11	18,81	19,50	25,81	22,84	-
<b>MÉLANGE 1C</b> ATM 15µg/ml & CTX 2µg/ml	20,76	20,19	19,57	19,26	20,61	20,28	-
<b>MÉLANGE 1D</b> ATM 10µg/ml & CTX 2µg/ml	37,41*	40,00*	36,51*	39,14*	40,00*	39,61*	-
	19,62§	19,80§	15,16§	15,14§	22,86§	13,71§	
<b>MÉLANGE 2</b> CTX 2µg/ml	15,74	15,93	14,71	15,72	14,88	14,93	-
<b>MÉLANGE 2B</b> CTX 4µg/ml	16,19	16,49	13,56	14,16	14,35	13,86	-

\* Analyse pré-incubation,

§ Post-incubation.

Chaque mélange avait un tube contrôle (CTRL) sans bactéries.

Le tableau 15 présente les valeurs de *crossing point* (CP) obtenues lors de ces essais. Nous avons calculé la moyenne des tubes SARM + Selle 1, SARM + Selle 2 et SARM + Selle 3 et la moyenne des résultats de CP des tubes SARM + ERV + Selle 1, SARM + ERV + Selle 2 et SARM + ERV + Selle 3 afin de déterminer la croissance du SARM en présence d'autres bactéries. La valeur de CP est sensiblement la même pour chaque mélange, cependant, les mélanges 2 et 2B ont des valeurs de CP plus bas que les autres mélanges. Puisque la valeur de CP est inversement proportionnelle à la concentration dans le bouillon d'enrichissement, nous pouvons considérer que la concentration bactérienne est plus élevée dans les mélanges 2 et 2B. De plus, nous avons analysé les bouillons d'enrichissement 1D avant et après l'incubation des tubes d'enrichissement.

Le tableau 16 présente la valeur moyenne des CP pour le SARM dans l'ensemble des tubes, l'écart type entre les valeurs ainsi que le coefficient de variation qui permet de mesurer la dispersion autour de la moyenne. Dans nos essais, nous cherchions à enrichir la croissance du SARM et de l'ERV malgré la présence de bactéries commensales. Ces calculs permettent de comparer la croissance du SARM et de l'ERV entre les différents mélanges. Il est à noter également que les valeurs de CP extrêmes (à l'extérieur des valeurs observées pour l'ensemble des tubes : SARM seul, SARM + ERV, SARM + Selle1, etc.) ont été retirées du calcul. Probablement dû à un problème de manipulation lors de l'extraction de l'ADN.

Les tableaux 17 et 18 démontrent les mêmes informations pour les valeurs de CP de l'ERV.

**Tableau 16 : Calculs statistiques des valeurs de CP pour la détection du SARM**

<b>BOUILLONS D'ENRICHISSEMENT</b>	<b>AMORCES NUC</b>			<b>AMORCES MECA</b>		
	<b>MOYENNE</b>	<b>ÉCART TYPE</b>	<b>CV %</b>	<b>MOYENNE</b>	<b>ÉCART TYPE</b>	<b>CV %</b>
<b>MÉLANGE 0</b> TZP 2µg/ml	18,33	3,5	19,0	18,72	3,9	21,0
<b>MÉLANGE 1</b> ATM 32µg/ml & CTX 2µg/ml	21,51	2,8	13,2	22,12*	1,5*	6,8*
<b>MÉLANGE 1B</b> ATM 20µg/ml & CTX 2µg/ml	19,12*	2,6*	13,4*	21,58*	3,5*	16,3*
<b>MÉLANGE 1C</b> ATM 15µg/ml & CTX 2µg/ml	20,34	1,1	5,3	19,94	1,0	5,0
<b>MÉLANGE 1D</b> ATM 10µg/ml & CTX 2µg/ml	16,10	2,3	14,3	15,97*	2,4*	15,0*
<b>MÉLANGE 2</b> CTX 2µg/ml	15,47	2,7	17,7	15,92	3,1	19,3
<b>MÉLANGE 2B</b> CTX 4µg/ml	15,02	2,4	16,1	15,11	2,4	16,0

\*Les valeurs extrêmes ont été retirées du calcul. Les unités de la moyenne et de l'écart type correspondent aux nombres de cycles.



**Tableau 17 : Résultats par PCR des bouillons avec les amorces ERV**

BOUILLONS D'ENRICHISSEMENT	ERV			ERV + SELLES			SARM +ERV-VANA + SELLES			CTRL
	ENT45/ENT1120/VAB			ENT45/ENT1120/VAB			ENT45/ENT1120/VAB			-
<b>MÉLANGE 0</b> TZP 2µg/ml	<b>28,98</b>	<b>31,69</b>	<b>35,15</b>	<b>32,33</b>	<b>25,42</b>	<b>33,89</b>	<b>28,10</b>	<b>25,27</b>	<b>30,84</b>	-
<b>MÉLANGE 1</b> ATM 32µg/ml & CTX 2µg/ml	16,57	16,86	17,25	17,13	16,01	19,68	16,06	16,67	20,16	-
<b>MÉLANGE 1B</b> ATM 20µg/ml & CTX 2µg/ml	22,82	19,90	<b>35,16</b>	16,79	16,47	19,06	17,95	17,86	19,06	-
<b>MÉLANGE 1C</b> ATM 15µg/ml & CTX 2µg/ml	17,17	17,55	18,77	17,06	17,25	19,58	17,20	17,41	19,72	-
<b>MÉLANGE 1D</b> ATM 10µg/ml & CTX 2µg/ml	16,25	16,94	18,77	17,85	18,19	20,02	19,05	19,33	21,20	-
<b>MÉLANGE 2</b> CTX 2µg/ml	18,80	19,20	20,17	17,80	18,21	18,62	19,50	19,99	21,95	-
<b>MÉLANGE 2B</b> CTX 4µg/ml	17,47	17,68	19,64	18,04	16,50	17,42	18,62	16,52	18,27	-

Dans le tableau 17 nous retrouvons les valeurs de CP des différentes paires d'amorce pour la détection de l'ERV et de l'ESV. Les valeurs retrouvées dans les tubes du mélange 0 sont plus élevées que l'ensemble des autres mélanges. Dans la section DISCUSSION, nous aborderons les raisons probables de cet écart de CP.

**Tableau 18 : Calculs statistiques des valeurs de CP pour la détection de l'ERV**

<b>BOUILLONS D'ENRICHISSEMENT</b>	<b>AMORCES ENT45</b>			<b>AMORCES ENT1120</b>			<b>AMORCES VANB</b>		
	<b>MOYENNE</b>	<b>ÉCART TYPE</b>	<b>CV %</b>	<b>MOYENNE</b>	<b>ÉCART TYPE</b>	<b>CV %</b>	<b>MOYENNE</b>	<b>ÉCART TYPE</b>	<b>CV %</b>
<b>MÉLANGE 0</b> TZP 2µg/ml	<b>30,00</b>	<b>4,5</b>	<b>14,9</b>	<b>27,38</b>	<b>8,0</b>	<b>29,4</b>	<b>32,21*</b>	<b>3,0*</b>	<b>9,2*</b>
<b>MÉLANGE 1</b> ATM 32µg/ml & CTX 2µg/ml	16,72	2,0	11,7	16,82	1,2	7,4	19,79*	0,8*	3,9*
<b>MÉLANGE 1B</b> ATM 20µg/ml & CTX 2µg/ml	17,25*	1,2*	7,2*	17,05	2,6	15,0	16,48*	2,0*	12,3*
<b>MÉLANGE 1C</b> ATM 15µg/ml & CTX 2µg/ml	16,88	0,8	4,8	17,22	0,5	3,2	19,15	1,2	6,1
<b>MÉLANGE 1D</b> ATM 10µg/ml & CTX 2µg/ml	18,05	1,2	6,9	18,45	1,1	6,1	20,25	1,2	5,8
<b>MÉLANGE 2</b> CTX 2µg/ml	18,54	1,0	5,2	18,99	1,0	5,3	19,92	2,5	12,4
<b>MÉLANGE 2B</b> CTX 4µg/ml	18,11	0,7	3,6	16,81	1,3	7,5	18,30	1,8	9,9

\* Les valeurs extrêmes ont été retirées du calcul. Les unités de la moyenne et de l'écart type correspondent aux nombres de cycles. Présence d'un entérocoque sensible à la vancomycine (ESV) dans l'une des 3 selles (S1).

Les valeurs des CP des différentes combinaisons bactériennes ont été comparées entre eux pour mieux évaluer les mélanges. Le calcul de la moyenne, de l'écart type et du coefficient de variation permet d'analyser la distribution des résultats par rapport à la moyenne du mélange. Considérant la valeur de CV basse, inférieur à 15%, cela indique que la distribution est homogène, ce qui démontre une bonne reproduction entre les tubes d'essai. (Voir le tableau 5 à la section 3.1.2)

Les mélanges 0 et 1 ont des valeurs de CV inférieur à 15% cependant ils se situent dans la dizaine contrairement aux autres mélanges qui se situent plus bas. Les valeurs d'écart type suivent la même tangente.

Les résultats obtenus dans cette section nous ont permis de faire un choix sur le mélange du bouillon d'enrichissement qui sera soumis à la validation. En comparant les valeurs de CP et la présence des bactéries présents sur les géloses ensemencées (section 4.1.1), nous sommes en mesure de choisir le mélange 1D pour des raisons discutées à la section 5.2.

## 4.2 Mise au point de la PCR en temps réel

**Tableau 19 : Alignement des séquences du gène *mecC* avec les séquences du gène *mecA***

gb JQ582125.1 _1756-3864	ACACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACTTAATTGGTAAATC	
gi 386685405_35247-37253	ACACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACTTAATTGGTAAATC	
gi 386685374_28175-30181	ACACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACTTAATTGGTAAATC	
gb JQ582126.1 _1756-3864	ACACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACTTAATTGGTAAATC	
gi 344176319_35681-37678	ACACATAGGGATGATATATACAAAATTATGCCCGAATTATGGTAAATC	(1776 F XI)
gi 333033673_1741-3738	ACACATAGGGATGATATATACAAAATTATGCCCGAATTATGGTAAATC	
	***** *	
	Sonde 1926F HEX	
gb JQ582125.1 _1756-3864	GGTACGCAGAAATCAAAATGAAACAAGGAGAAACTGGCAGACAAATTG	Fichon 2012 mecA compR
gi 386685405_35247-37253	GGTACGCAGAAATCAAAATGAAACAAGGAGAAACTGGCAGACAAATTG	Encadré : IDT-F 1902sccX
gi 386685374_28175-30181	GGTACGCAGAAATCAAAATGAAACAAGGAGAAACTGGCAGACAAATTG	
gb JQ582126.1 _1756-3864	GGTACGCAGAAATCAAAATGAAACAAGGAGAAACTGGCAGACAAATTG	
gi 344176319_35681-37678	GGTACGCAGAAATCAAAATGAAACAAGGAGAAACTGGCAGACAAATTG	
gi 333033673_1741-3738	GGTACGCAGAAATCAAAATGAAACAAGGAGAAACTGGCAGACAAATTG	
	***** *	
gb JQ582125.1 _1756-3864	GGTGGTTTATATCATATGATAAAGATAATCCAAACATGATGATGGCTATT	Sonde 1926F HEX
gi 386685405_35247-37253	GGTGGTTTATATCATATGATAAAGATAATCCAAACATGATGATGGCTATT	
gi 386685374_28175-30181	GGTGGTTTATATCATATGATAAAGATAATCCAAACATGATGATGGCTATT	
gb JQ582126.1 _1756-3864	GGTGGTTTATATCATATGATAAAGATAATCCAAACATGATGATGGCTATT	
gi 344176319_35681-37678	GGTGGTTTATATCATATGATAAAGATAATCCAAACATGATGATGGCTATT	
gi 333033673_1741-3738	GGTGGTTTATATCATATGATAAAGATAATCCAAACATGATGATGGCTATT	
	***** *	
gb JQ582125.1 _1756-3864	AATGTTAAAGATGTCACAGATAAAGGATGGCTAGCTACAATGCCAAAAT	comp 2051R X
gi 386685405_35247-37253	AATGTTAAAGATGTCACAGATAAAGGATGGCTAGCTACAATGCCAAAAT	
gi 386685374_28175-30181	AATGTTAAAGATGTCACAGATAAAGGATGGCTAGCTACAATGCCAAAAT	
gb JQ582126.1 _1756-3864	AATGTTAAAGATGTCACAGATAAAGGATGGCTAGCTACAATGCCAAAAT	
gi 344176319_35681-37678	AATGTTAAAGATGTCACAGATAAAGGATGGCTAGCTACAATGCCAAAAT	(comp IDT 1940R XI)
gi 333033673_1741-3738	AATGTTAAAGATGTCACAGATAAAGGATGGCTAGCTACAATGCCAAAAT	
	***** *	
gb JQ582125.1 _1756-3864	CTCAGGTAAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACG	
gi 386685405_35247-37253	CTCAGGTAAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACG	
gi 386685374_28175-30181	CTCAGGTAAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACG	
gb JQ582126.1 _1756-3864	CTCAGGTAAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACG	
gi 344176319_35681-37678	CTCAGGTAAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACG	
gi 333033673_1741-3738	CTCAGGTAAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACG	
	***** *	

Alignement fait par *ClustalW* EF : Oligonucléotides conçu par Frost, IDT : conçu par le logiciel IDT, BP : provenant article (Pichon *et al.*, 2012). Garcia : issu de l'article (Garcia *et al.*, 2011)

Le tableau 19 est un exemple d'alignement fait par le logiciel *ClustalW* disponible en ligne et qui nous permet de comparer les séquences d'ADN de nos bactéries d'intérêt. L'absence d'astérisque indique qu'il y a une différence de nucléotide entre les souches (*mismatch*). À partir de ce logiciel, nous avons sélectionné les oligonucléotides potentiels et nous les avons comparés avec les amorces et les sondes retrouvées dans la littérature. (Pichon *et al.*, 2012; Garcia *et al.*, 2011)

La mise au point de la PCR multiplexe a suscité plusieurs étapes. Nous avons comparé différentes combinaisons et différentes concentrations d'amorces afin d'avoir la PCR la plus efficace. Le tableau 11 à la section 4.2.1 décrit les concentrations des amorces et des sondes utilisées dans la PCR. Nous avons comparé différentes températures d'acquisition de la fluorescence (55°C, 60°C et 72°C) de la sonde avec différentes concentration d'amorces (0,15 µM-0,45µM et 0,5µM-0,07µM) à 40sec d'hybridation. Concernant la PCR ERV, les amorces sont en symétrie car les sondes vanA(F) et vanB(R) ne sont pas sur le même brin. Pour la PCR SARM, nous utilisons les amorces en asymétries, c'est-à-dire qu'elles n'ont pas la même concentration dans le milieu réactionnel, afin d'être en mesure de faire une courbe de dénaturation. La technique élaborée par Frost, Deslandes et D-Paquette, permet d'utiliser des sondes d'hydrolyse et d'obtenir une courbe de dénaturation après l'étape de l'amplification PCR.

Le tableau suivant démontre les différentes combinaisons des amorces et sondes du PCR multiplex. Les trois première colonnes présentes les amorces et sonde en PCR simplexe (un gène). Les colonnes 4, 5 et 6 démontre les résultats obtenus avec les trois possibilités de combinaison de PCR duplexe (deux gènes) et finalement, la dernière colonne présente la PCR en multiplexe. Les souches utilisées lors de cet essai sont, SARM avec *mecA*, SARM avec *mecC*, *S. aureus* sensible à la méticilline, un SARM-AC et un *S. epidermidis* avec le gène *mecA*. La sonde nuc se détecte avec le filtre de 510nm tandis que la sonde *mecA-mecC* est détectée par le filtre 580nm. Puisqu'il s'agit d'extrait de souche pure, la concentration bactérienne dans les différents puits demeure la même. La valeur de *T<sub>M</sub>* pour le gène *nuc* est d'environ 69,0°C, pour le gène *mecA*, la température est de 63,5°C et de 58,0°C pour le gène *mecC*. Puisqu'il s'agit de la même sonde pour le *mecA* et le *mecC*, cette différence de

température de dénaturation permet d'indiquer la présence de la nouvelle souche SARM.

Lors de cette expérience, nous avons suivi les paramètres décrits à la section 3.4.1.

**Tableau 20 : Résultats PCR multiplexe**

SOUCHES		NUC /FAM (510nm)		MECA /HEX (580nm)		MECC /HEX		NUC-MECA		NUC-MECC		MECA-MECC		NUC-MECA-MECC	
		CP	TM	CP	TM	CP	TM	CP	TM	CP	TM	CP	TM	CP	TM
MECA	nuc 510nm	26,04	68,73	–	–	–	–	25,32	68,89	25,12	68,59	–	–	25,91	68,86
	mec 580nm	–	–	23,35	62,93	0,00	0,00	24,99	63,46	0,00	0,00	24,70	63,13	25,54	63,51
MECC	nuc 510nm	22,84	68,86	–	–	–	–	23,80	68,92	24,22	68,95	–	–	24,34	69,13
	mec 580nm	–	–	0,00	0,00	23,51	57,94	0,00	0,00	25,07	57,42	25,49	57,80	24,87	58,08
SASM	nuc 510nm	23,44	68,91	–	–	–	–	23,49	68,94	25,34	68,97	–	–	24,32	68,88
	mec 580nm	–	–	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SARM- AC	nuc 510nm	21,00	68,88	–	–	–	–	24,81	69,01	25,07	68,92	–	–	0,00*	0,00
	mec 580nm	–	–	21,07	63,01	0,00	0,00	24,30	62,98	0,00	0,00	24,12	63,23	0,00*	0,00
<i>S. EPI</i>	nuc 510nm	35,00	69,55	–	–	–	–	0,00	0,00	35,00	0,00	0,00	–	<b>24,85</b>	68,53/0,07
	mec 580nm	–	–	26,87	63,10	0,00	0,00	28,65	63,64	0,00	0,00	28,68	63,66	24,24	62,54
H <sub>2</sub> O	nuc 510nm	0,00	0,00	–	–	–	–	0,00	0,00	0,00	0,00	–	–	0,00	0,00
	mec 580nm	–	–	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

\*Erreur technique, le spécimen a été déposé dans le puits du *S. epidermidis* qui ne possède pas le gène *nuc*, spécifique au *S. aureus*.

### 4.3 Résultats de la validation du bouillon d'enrichissement

Au total, 99 volontaires ont participé à notre étude ; 51 femmes et 48 hommes provenant de nos trois centres associés, 48,5% des volontaires étaient hospitalisés au CSSS Richelieu-Yamaska (St-Hyacinthe), 1,0% provenait du CSSS IUGS (Sherbrooke) et 50,5% provenaient du CIUSSS Estrie CHUS (Sherbrooke). 24,5% des participants étaient connus porteur du SARM, 64,6% n'étaient porteur du SARM et 11,1% des participants n'avaient pas d'historique de dépistage. 36,7% des participants étaient connus porteur de l'ERV, 43,4% n'étaient pas porteur de la souche et 20,2% n'avaient pas de dépistage fait pour la détection de l'ERV.

Voici les antibiotiques (ATB) administrés aux participants lors de la validation du bouillon d'enrichissement. Les participants ayant une couverture ATB 32,3% : Ciprofloxacine 11,3%, Tazocin 5,2%, Vancomycine 4,1%, Avelox (moxifloxacine) 3,1%, Méropénème 3,1%, Métronidazole 3,1%, Imipenem 2,1%, Gentamycine 2,1%, Céfazoline 2,1%, Amoxicilline 2,1%, Clavulin 2,1%, Daptomycine 2,1%, Clindamycine 1,0%, Diflucan (Fluconazole) 1,0%, Ceftriaxone 1,0%, Acyclovir 1,0%, Triméthoprim sulfaméthoxazole (STX) 1,0%, Linézolide 1,0%, Tobramycine 1,0%, Indéterminé 8,1% et les participants qui n'ont pas de couverture ATB 59,6%.

**Tableau 21 : Description de la cohorte**

<b>PARAMÈTRES</b>		<b>NOMBRE</b>	<b>POURCENTAGE (%)</b>
<b>NBRE PARTICIPANT</b>	Total	99	100
	Femme	51	51,5
	Homme	48	46,5
<b>PROVENANCE DES PARTICIPANTS</b>			
	CSSS RY	48	48,5
	CSSS IUGS	1	1,0
	CHUS	48	48,5
<b>ANALYSES CLINIQUES</b>			
<b>Détection SARM</b>			
	Oui	23	23,2
	Non	63	63,6
	Indéterminé	11	11,1
<b>Détection ERV</b>			
	Oui	36	36,4
	Non	36	36,4
	Indéterminé	25	25,3
<b>COUVERTURE ATB</b>			<b>32,3</b>
	Ciprofloxacine	11	11,1
	Tazocin	5	5,1
	Vancomycine	4	4,0
	Avelox (moxifloxacine quinolone)	3	3,0
	Flagil (métronidazole) anti-parasitaire	3	3,0
	Meropeneme	3	3,0
	Amoxicilline	2	2,0
	Céfazoline	2	2,0
	Clavulin	2	2,0
	Daptomycine	2	2,0
	Imipenem	2	2,0
	Gentamycine	2	2,0
	Acyclovir (antiviraux HSV)	1	1,0
	Clindamycine	1	1,0
	Ceftriaxone (céphalo 3 G idem Céfotaxime)	1	1,0
	Diflucan (Fluconazole) Antifongique	1	1,0
	Linézolide	1	1,0
	STX	1	1,0
	Tobramycine	1	1,0
	<b>Inconnu</b>	<b>8</b>	<b>8,1</b>
	<b>Pas de couverture ATB</b>	<b>57</b>	<b>57,6</b>

**Tableau 22 : Résultats de la validation des bouillons d'enrichissement**

PATIENTS		PCR BOUILLONS			PCR COLONIES			SARM	ERV
		TZP	1D	NEUTRE	TZP	1D	NEUTRE		
1	SARM	-	-	-	-	0	0	NON	NON
	ERV*	+	+	+	-	-	-		
2	SARM	-	-	-	0	0	0	NON	NON
	ERV*	-	-	-	-	-	-		
3	SARM	-	-	-					
	ERV*	±	±	+					
4	SARM	-	-	-					
	ERV*	+	+	+					
5	SARM	-	-	-					
	ERV*	+	+	+					
6	SARM	-	-	-					
	ERV*	+	+	+					
7	SARM	-	-	-					
	ERV*	+	+	+					
8	SARM	-	-	-	-	-		NON	NON
	ERV*	-	-	-					
9*	SARM		+			+		OUI	NON
	ERV		+			-			
10	SARM		-						
	ERV*		+						
11	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
12	SARM		-						
	ERV*		-						
13	SARM		-						
	ERV*		-						
14	SARM	-	-	-				NON	NON
	ERV*	-	-	-		-	-		
15	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
16	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					

PATIENTS		PCR BOUILLONS			PCR COLONIES			SARM	ERV
		TZP	1D	NEUTRE	TZP	1D	NEUTRE		
17	SARM	-	-	-					
	ERV*	+	+	+					
18	SARM	-	-	-				NON	OUI
	ERV*	+	±	±	+	+	+		
19	SARM	-	-	-					
	ERV*	+	+	+					
20	SARM	-	-	-					
	ERV*	±	+	+					
21	SARM	-	-	-					
	ERV*	±	+	-					
22	SARM	-	-	-				NON	NON
	ERV*	-	-	-		-			
23	SARM	-	-	-				NON	NON
	ERV*	-	-	-		-			
24	SARM	-	-	-				NON	NON
	ERV*	-	-	-		-			
25	SARM	-	-	-					
	ERV*	+	+	+					
26	SARM	-	-	-					
	ERV*	+	+	+					
27	SARM	-	-	-					
	ERV*	-	-	-					
28	SARM	-	-	-					
	ERV*	-	-	-					
29	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
30	SARM	-	-	-					
	ERV*	+	+	+					
31	SARM	-	-	-					
	ERV*	+	+	+					
32	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					



PATIENTS		PCR BOUILLONS			PCR COLONIES			SARM	ERV
		TZP	1D	NEUTRE	TZP	1D	NEUTRE		
33	SARM*	+	+	+					
	ERV	-	-	-					
34	SARM	-	-	-					
	ERV*	+	+	+					
35*	SARM	+	+	+					
	ERV	-	-	-					
36*	SARM	±	+	±		+		OUI	NON
	ERV	-	-	-					
37	SARM	-	-	-				NON	OUI
	ERV*	±	±	-	+	+	-		
38	SARM*	+	+	±			-	NON	NON
	ERV	-	-	-					
39	SARM	-	-	-				NON	OUI
	ERV*	+	+	+	+	+	+		
40	SARM	-	-	-				NON	OUI
	ERV*	+	+	+	+	+	+		
41	SARM	-	-	-				NON	OUI
	ERV*	+	+	+	-	+	-		
42*	SARM	+	+	+		±		OUI	NON
	ERV	±	-	±					
43	SARM*	+	+	±	-		-	NON	NON
	ERV	-	-	-					
44	SARM*	-	+	-	-	-	-	NON	NON
	ERV	-	-	-					
45	SARM	-	-	-				NON	OUI
	ERV*	+	+	+	+	+	+		
46	SARM	-	-	-					
	ERV*	-	-	-					
47	SARM	-	-	-				NON	OUI
	ERV*	+	+	+	+	+	+		
48	SARM	-	-	-				NON	OUI
	ERV*	+	+	+	+	+	+		
101	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					

PATIENTS		PCR BOUILLONS			PCR COLONIES			SARM	ERV
		TZP	1D	NEUTRE	TZP	1D	NEUTRE		
102	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
103	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
104	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
105	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
106	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
107	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
108	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
109	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
110	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
111	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
112	SARM	-	-	-					
	ERV*	-	-	±					
113*	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
114	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
115	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
116	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
117	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
118	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					

PATIENTS		PCR BOUILLONS			PCR COLONIES			SARM	ERV
		TZP	1D	NEUTRE	TZP	1D	NEUTRE		
119*	SARM	-	±	-	+	+	+	OUI	NON
	ERV	-	-	-					
120	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
121	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
122	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
123	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
124*	SARM	-	-	-	±	+	+	OUI	NON
	ERV	-	-	-					
125	SARM	-	-	-	+	-	-	OUI	NON
	ERV	-	-	-					
126*	SARM	+	±	+	-	-	-	NON	NON
	ERV	-	-	-					
127	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
128	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
129	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
130	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
131	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
132	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
133	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
134	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					

PATIENTS		PCR BOUILLONS			PCR COLONIES			SARM	ERV
		TZP	1D	NEUTRE	TZP	1D	NEUTRE		
135	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
136*	SARM	-	-	-					
	ERV	-	+	-					
137	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
138	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
139	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
140	SARM*	+	+	+	+	+	+	OUI	NON
	ERV	-	-	-					
142	SARM*	-	-	-	+	+	-	OUI	NON
	ERV	-	-	-					
143	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
144	SARM							NON	NON
	ERV*	+	+	+	0	0	-		
145	SARM*	+	+	+	+	+	+	OUI	NON
	ERV	-	-	-					
146	SARM	-	-	-					
	ERV	-	-	-					
147	SARM	-	-	-	-	-		NON	NON
	ERV	-	-	-					
148	SARM*	+	+	+	+	+	+	OUI	NON
	ERV	-	-	-					
203	SARM*	-	-	-	±	+	+	OUI	OUI
	ERV	-	-	-					
301	SARM	-	-	-	0	+	+	OUI	NON
	ERV	-	-	-					
302	SARM	-	-	-	-	-	-	NON	NON
	ERV	-	-	-					
303	SARM*	-	-	-	+	+	+	OUI	NON
	ERV	-	-	-					

Dépistage avec amorces de référence. TZP : bouillon de référence (mélange 0), 1D : bouillon à l'étude, Neutre : bouillon sans antibiotique. \* dépistage avec PCR multiplex. Résultats : + : positif, - : négatif,  $\pm$  : résultat faiblement positif. 0 : aucune colonie retrouvée sur les géloses. Tous les bouillons d'enrichissement ont été ensemencés sur des géloses au sang, *manitol salt* et Bile esculine agar.

Tel que décrit dans la section MATÉRIELS & MÉTHODES, nous avons obtenu les spécimens patients sur une base régulière et nous avons ensemencé un bouillon d'enrichissement sans antibiotique. Par la suite, nous avons divisé le bouillon en trois parts et ajouter la concentration nécessaire d'antibiotique pour chacun des mélanges. Les bouillons ont été mis à l'étuve pour 18h d'incubation. Après leur incubation, l'ADN des bouillons d'enrichissement à l'étude ont été extraient selon la méthode décrite dans la section 3.2. Nous avons analysé les différents bouillons avec les mêmes paramètres que la PCR de référence. Nous avons utilisé les amorces nuc et mecA. Nous avons ensemencé tous les bouillons sur des géloses spécifiques aux bactéries recherchées. Toutes les colonies susceptibles d'être un entérocoque ou un *S. aureus* ont été resoumis à la PCR de référence. Le tableau 22 présente les résultats obtenus lors de cette validation. Le signe + signifie que nous avons retrouvé une colonie SARM ou ERV dans le bouillon. Le signe – indique que la colonie n'était pas un SARM ou un ERV et le signe 0 signifie que nous n'avons pas trouvé de colonie spécifique au SARM ou à l'ERV dans le bouillon d'enrichissement. En règle générale, les gènes recherchés sont retrouvés dans l'ensemble des bouillons. Cependant, les colonies SARM et ERV n'ont pas été retrouvé dans les mêmes proportions dans les bouillons.

À partir des mêmes extraits de bouillons analysés avec la méthode de référence, nous les avons analysés en utilisant les amorces et les sondes de notre méthode de détection. Nous avons repris les extraits dont nous nous attendions à la présence d'un SARM ou d'un ERV et dont nos résultats diffèrent avec les résultats attendus.

**Tableau 23 : Résultats d'analyse PCR des bouillons d'enrichissement : Sondes et amorces PCR multiplexe**

PATIENTS		PCR BOUILLONS			PCR COLONIES			SARM	ERV
		TZP	1D	NEUTRE	TZP	1D	NEUTRE		
1	SARM	-	-	-	-	0	0	NON	NON
	ERV*	+	+	+	-	-	-		
2	SARM	-	-	-	0	0	0	NON	NON
	ERV*	-	-	-	-	-	-		
3	SARM	-	-	-					
	ERV*	±	+	-	0	0			
4	SARM	-	-	-					
	ERV*	+	+	+	0	0	0		
5	SARM	-	-	-					
	ERV*	+	+	+	0	0	0		
6	SARM	-	-	-					
	ERV*	±	+	+	0	0	0		
7	SARM	-	-	-					
	ERV*	+	+	+	0	0	0		
8	SARM	-	-	-	-	-		NON	NON
	ERV*	-	-	-					
9*	SARM		+			+		OUI	NON
	ERV		+			-			
10	SARM	-	-	-					
	ERV*	+	+	+	0	0	0		
12	SARM	-	-	-					
	ERV*	-	-	-					
13	SARM	-	-	-					
	ERV*	-	-	-					
14	SARM	-	-	-				NON	NON
	ERV*	-	-	-		-	-		
17	SARM	-	-	-					
	ERV*	±	+	±	0	0	0		
18	SARM	-	-	-				NON	OUI
	ERV*	+	+	+	+	+	+		
19	SARM	-	-	-					
	ERV*	+	+	+	0	0	0		
20	SARM	-	-	-					
	ERV*	±	+	-	0	0			
21	SARM	-	-	-					
	ERV*	+	+	+	0	0	0		
22	SARM	-	-	-				NON	NON
	ERV*	-	-	-		-			
23	SARM	-	-	-				NON	NON
	ERV*	-	-	-		-			
24	SARM	-	-	-				NON	NON
	ERV*	-	-	-		-			
25	SARM	-	-	-					
	ERV*	+	+	+	0	0	0		
26	SARM	-	-	-					
	ERV*	+	+	+	0	0	0		
27	SARM	-	-	-					
	ERV*	-	-	-					

PATIENTS		PCR BOUILLONS			PCR COLONIES			SARM	ERV
		TZP	1D	NEUTRE	TZP	1D	NEUTRE		
28	SARM	-	-	-					
	ERV*	-	-	-					
30	SARM	-	-	-					
	ERV*	+	+	+	0	0	0		
31	SARM	-	-	-					
	ERV*	+	+	+	0	0	0		
33	SARM*	+	+	+	0	0	0		
34	SARM	-	-	-					
	ERV*	+	+	+	0	0	0		
35*	SARM	+	+	+	0	0	0		
	ERV	-	-	-					
36*	SARM	±	+	-	0	+	0	OUI	NON
	ERV	-	-	-					
37	SARM	-	-	-				NON	OUI
	ERV*	±	±	-	+	+	-		
38	SARM*	-	+	±	0	-		NON	NON
	ERV	-	-	-					
39	SARM	-	-	-				NON	OUI
	ERV*	+	+	±	+	+	+		
40	SARM	-	-	-				NON	OUI
	ERV*	+	+	+	+	+	+		
41	SARM	-	-	-				NON	OUI
	ERV*	+	+	+	-	+	-		
42*	SARM	+	+	+	0	±	0	OUI	NON
	ERV	±	-	±	0	0	0		
43	SARM*	+	+	+	-	0	-	NON	NON
	ERV	-	-	-					
44	SARM*	+	+	+	-	-	-	NON	NON
	ERV	-	-	-					
45	SARM	-	-	-				NON	OUI
	ERV*	+	+	+	+	+	+		

PATIENTS		PCR BOUILLONS			PCR COLONIES			SARM	ERV
		TZP	1D	NEUTRE	TZP	1D	NEUTRE		
46	SARM	-	-	-					
	ERV*	-	-	-					
47	SARM	-	-	-				NON	OUI
	ERV*	+	+	+	+	+	+		
48	SARM	-	-	-				NON	OUI
	ERV*	+	+	+	+	+	+		
112	SARM	-	-	-					
	ERV*	-	-	±			0		
113*	SARM	+	+	+	0	0	0		
	ERV	-	-	-					
119*	SARM	±	+	-	+	+	+	OUI	NON
	ERV	-	-	-					
124*	SARM	+	+	-	±	+	+	OUI	NON
	ERV	-	-	-					
126*	SARM	±	-	-	-	-	-	NON	NON
	ERV	-	-	-					
136*	SARM	-	-	-					
	ERV	±	+	-	0	0			
140	SARM*	+	+	+	+	+	+	OUI	NON
	ERV	-	-	-					
142	SARM*	-	+	-	+	+	-	OUI	NON
	ERV	-	-	-					
144	SARM							NON	NON
	ERV*	+	+	+	0	0	-		
145	SARM*	+	+	+	+	+	+	OUI	NON
	ERV	-	-	-					
148	SARM*	+	+	+	+	+	+	OUI	NON
	ERV	-	-	-					
203	SARM*	+	+	+	±	+	+	OUI	OUI
	ERV	-	-	-					
303	SARM*	-	-	-	+	+	+	OUI	NON
	ERV	+	+	±	0	0	0		

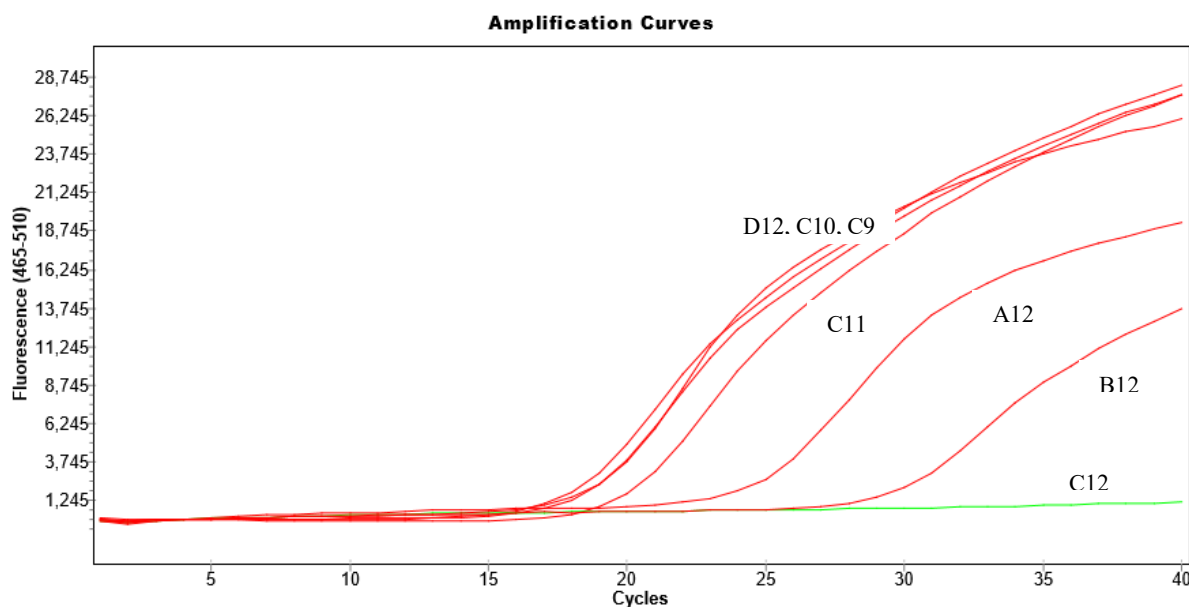
\* Dépistage avec PCR multiplexe PCR. + = positif, - négatif, ± résultat faiblement positif. 0 = aucune colonie

Le tableau 23 présente les résultats de la validation des bouillons d'enrichissement. Le bouillon TZP est notre bouillon de référence (mélange 0), élaboré Frost et Deslandes. Il s'agit du bouillon neutre avec une concentration de 2µg/ml de Tazocin (TZP). Le bouillon 1D est le bouillon d'enrichissement dont nous avons fait la mise au point et qui est composé du bouillon neutre avec 2µg/ml de céfotaxime (CTX) et de 10µg/ml d'aztréonam (ATM). Le bouillon neutre est le bouillon sans antibiotique. Après l'incubation des tubes. Nous retrouvons sensiblement les mêmes résultats au tableau 23 que le tableau 22.

Ces tableaux rapportent les résultats obtenus lors de l'analyse des bouillons d'enrichissement. Après avoir fait l'extraction de l'ADN des bactéries présentes dans les bouillons, l'ADN recueilli est analysé par PCR avec les amorces cliniques et du SYRB Green (Roche Diagnostics). Lorsque l'un des trois bouillons à l'étude démontrait un *Crossing point* (CP) en bas de 28 cycles et que la température de dénaturation (TM) était autour de 79°C pour le gène *nuc* et 76°C pour le gène *mecA*, les trois bouillons étaient ensemencés. Le bouillon Bile esculine avec vancomycine a été ensemencé seulement sur gélose car l'esculine gêne la PCR lorsque l'ADN est extrait avec la méthode Clinique (lyse alcaline). L'extraction directement sur le bouillon bile esculine nécessite une purification de l'ADN soit en utilisant des colonnes de silice ou soit en utilisant un appareil d'extraction comme le EasyMag de Biomérieux. Les bouillons d'enrichissement sont ensemencés sur des géloses au sang de mouton (Oxoid) et des géloses Mannitol Salt Agar (Oxoid) afin d'y trouver une colonie caractéristique du SARM. Et sur des géloses au sang de mouton (Oxoid) et des géloses Bile Esculine Azide (BEA, Oxoid) pour la recherche de l'ERV. Le signe + indique que les critères de positivité sont respectés, le signe - indique que le résultat est négatif et le signe ± indique que le CP était plus haut que la valeur seuil de 28 cycles, mais que le résultat de TM correspondait à la valeur recherchée. L'étape de l'ensemencement des bouillons sur géloses est nécessaire car il peut y avoir la présence d'un *S. aureus* sensible à la méticilline en combinaison avec un *S. epidermidis* possédant le gène de résistance *mecA*. Les résultats seraient alors *nuc* +, *mecA* +. Concernant l'ERV, l'utilisation de géloses confirmait la présence de la bactérie.

Le premier tableau représente les résultats PCR des bouillons avec les amorces SARM cliniques et le second tableau représente les résultats obtenus avec les amorces et les sondes du PCR multiplex. Concernant la détection des gènes *vanA* et *vanB*, les résultats du premier tableau sont détectés par SYBR Green (Roche Diagnostics) alors que le second tableau, les résultats sont obtenus par sondes et le réactif *FastStart TaqMan® Probe Master* de Roche Diagnostics. Il s'agit des mêmes amorces puisqu'au laboratoire de microbiologie clinique il n'y a pas de détection de l'ERV par PCR. Par souci économique et de temps, seuls les résultats positifs ou divergents ont été repris par la PCR multiplex.

### 4.3 Exemples de courbes PCR multiplexe nuc/mecA



**Figure 15 : Courbes PCR avec la sonde nuc patient numéro 145**

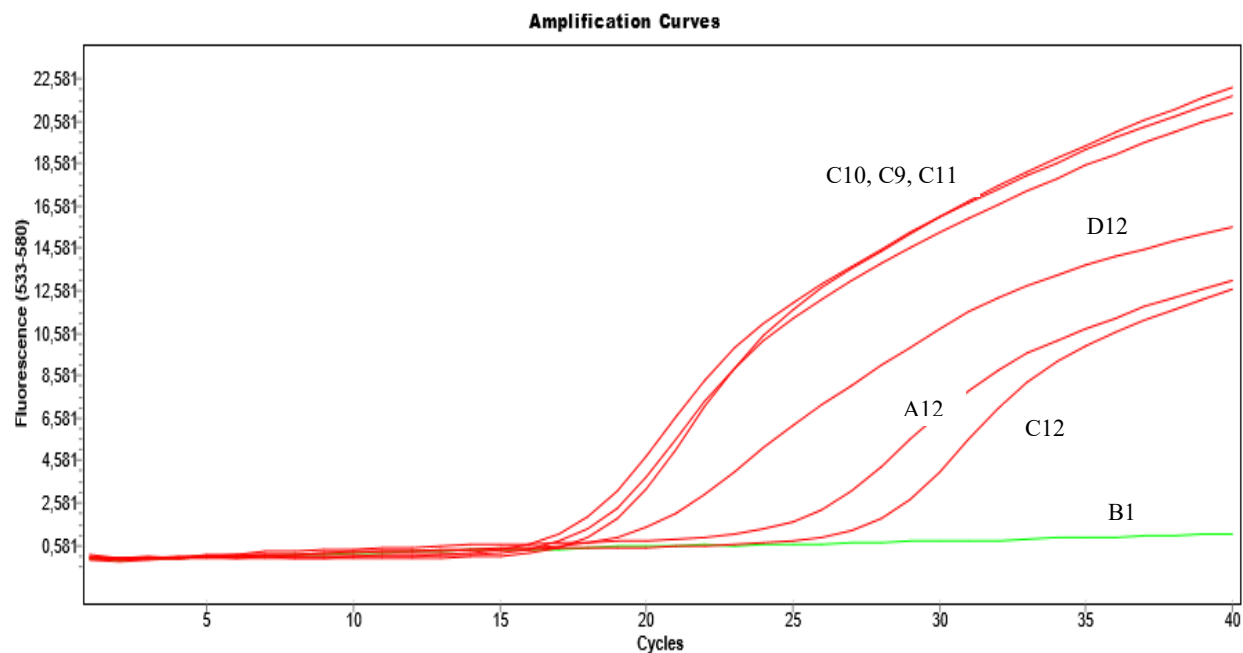
Détection du gène *nuc* avec les amorces 355F / 501R et la sonde nuc 389F FAM. La PCR a été réalisée sur les colonies isolées du bouillon d'enrichissement. Les contrôles positifs sont le SARM, le SARM avec gène *mecC* et le SASM. Le contrôle négatif est le *S. epidermidis* qui ne possède pas le gène *nuc* spécifique au *S. aureus*. Analyse du 2014-11-17.

**Tableau 24 : Valeurs de *Crossing point* (CP) des colonies isolées avec la sonde nuc**

POSITION	NAME	CP
<b>C9</b>	145-0	18,31
<b>C10</b>	145-1D	17,83
<b>C11</b>	145-N	19,68
<b>C12</b>	<i>S. epidermidis</i>	-
<b>D12</b>	<i>mecC</i>	18,78
<b>A12</b>	SARM	24,70
<b>B12</b>	SASM	29,63

La valeur du CP est en fonction de la concentration du spécimen extrait. Plus la valeur de CP est basse, plus la concentration est élevée.





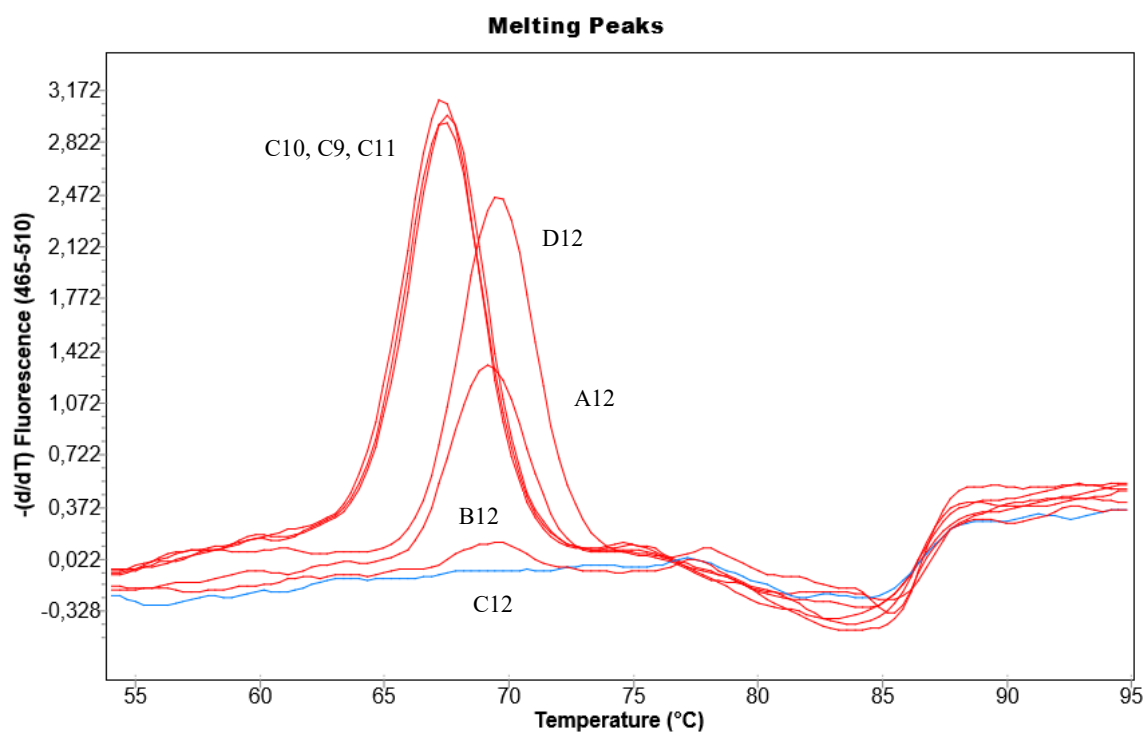
**Figure 16 : Courbes PCR avec la sonde mecAC patient numéro 145**

Détection du gène *mecA*, *mecC* avec les amorces *mecA* 1902F / 2051R, amorces *mecC* 1777F / 1940R et la sonde *mecAC* 1926F HEX. La PCR a été réalisée sur les colonies isolées du bouillon d'enrichissement. Les contrôles positifs sont le SARM, le SARM avec gène *mecC* et le *S. epidermidis*. Le contrôle négatif est le SASM qui ne possède pas le gène de résistance *mec*. Analyse du 2014-11-17.

**Tableau 25 : Valeurs de *Crossing point* (CP) des colonies isolées avec la sonde *mecAC***

POSITION	NAME	CP (CYCLE)	$\Delta$ CP NUC/MECAC
C9	145-0	17,81	0,5
C10	145-d	17,31	0,52
C11	145-n	18,17	1,51
C12	<i>S. epidermidis</i>	28,62	-
D12	<i>mecC</i>	20,12	1,34
A12	SARM	25,58	0,88
B12	SASM	-	-

La différence ( $\Delta$ CP) entre les CP obtenus avec les amorces/sonde nuc et ceux obtenus avec les amorces/sonde *mecAC* permet de voir l'efficacité de la PCR.

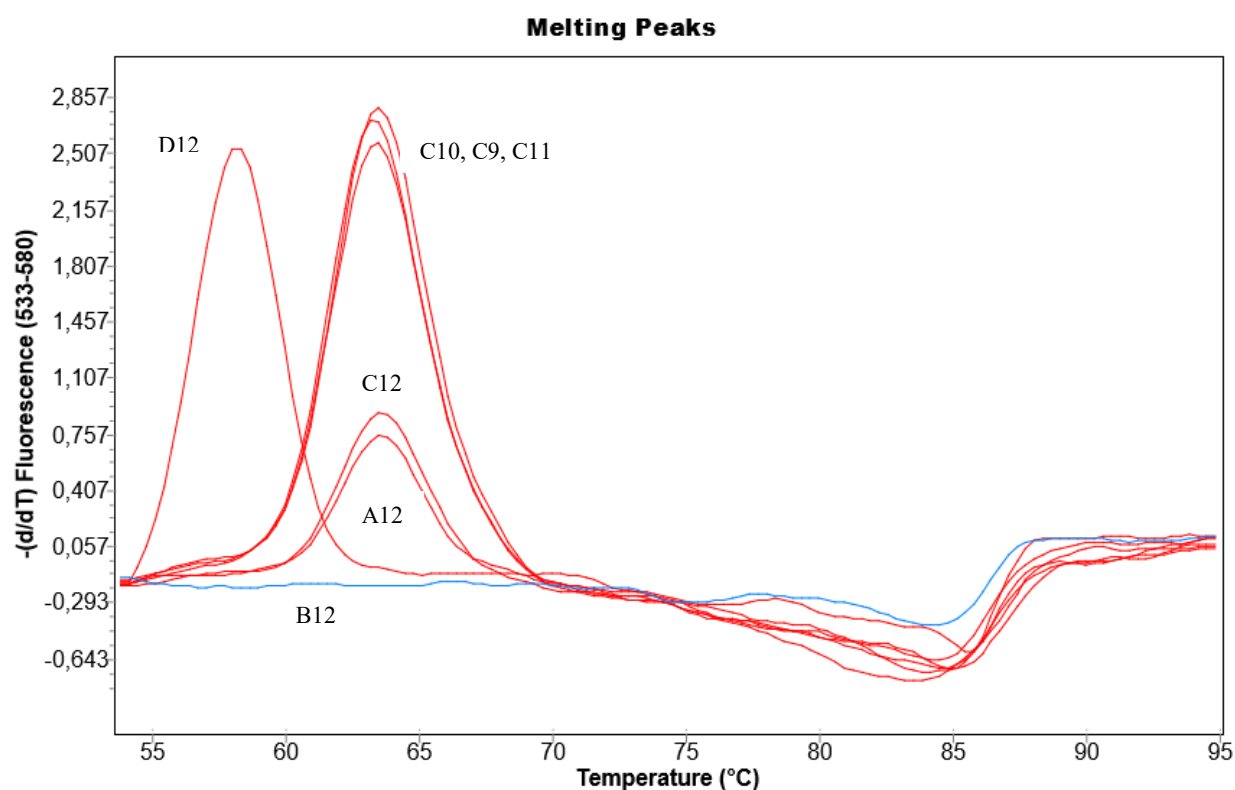


**Figure 17 : Courbes de dénaturation avec la sonde nuc patient numéro 145**

**Tableau 26 : Valeurs de température de dénaturation (TM) des colonies isolées avec la sonde nuc**

POSITION	NAME	TM (°C)
<b>C9</b>	145-0	67,51
<b>C10</b>	145-d	67,41
<b>C11</b>	145-n	67,67
<b>C12</b>	<i>S. epidermidis</i>	-
<b>D12</b>	<i>mecC</i>	69,80
<b>A12</b>	SARM	69,33
<b>B12</b>	SASM	69,51

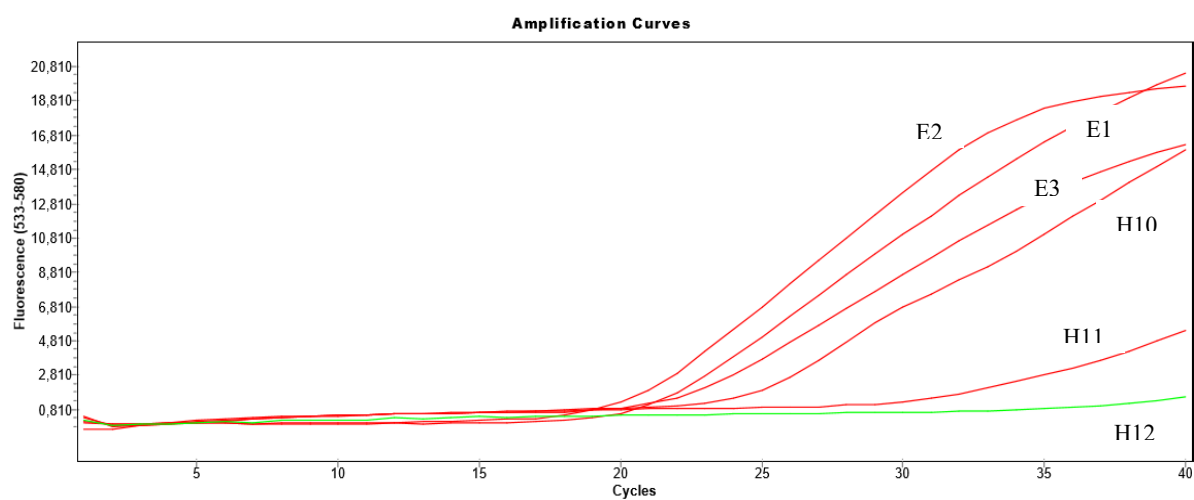
La souche du patient numéro 145 n'a pas la même valeur de TM que les souches contrôles utilisées lors de l'analyse. Une différence d'environ 2°C entre la valeur de TM du SASM et de la souche patient 145.



**Figure 18 : Courbes de dénaturation avec la sonde mecAC patient numéro 145**

**Tableau 27 : Valeurs de température de dénaturation (TM) des colonies isolées avec la sonde mecAC**

POSITION	NAME	TM (°C)
<b>C9</b>	145-0	63,45
<b>C10</b>	145-d	63,37
<b>C11</b>	145-n	63,55
<b>C12</b>	<i>S. epidermidis</i>	63,60
<b>D12</b>	<i>mecC</i>	58,16
<b>A12</b>	SARM	63,60
<b>B12</b>	SASM	-



**Figure 19 : Courbes PCR avec la sonde vanA patient numéro 5**

**Tableau 28 : Valeurs de *Crossing point* (CP) des colonies isolées avec la sonde vanA**

POSITION	NAME	CP (CYCLE)
<b>E1</b>	5-0	21,08
<b>E2</b>	5-d	20,33
<b>E3</b>	5-n	22,17
<b>H10</b>	<i>vamA</i>	24,53
<b>H11</b>	<i>vanB</i>	30,55
<b>H12</b>	<i>E. gallinarum</i>	-

#### 4.4 Analyses statistiques

**Tableau 29 : Tableau de contingence**

		ÉTALON		
		POSITIF	NÉGATIF	TOTAL
RÉSULTATS OBTENUS	POSITIF	VP	FP	VP + FP
	NÉGATIF	FN	VN	FN + VN
	TOTAL	VP + FN	FP + VN	

L'analyse des différents bouillons d'enrichissement à l'étude a été réalisée en utilisant les notions de vrai positif (VP), vrai négatif (VN), de faux positif (FP) et faux négatif (FN). Les trois bouillons ont été comparés avec notre étalon, c'est-à-dire qu'à partir du moment où nous trouvions une colonie positive (SARM+ et/ou ERV+) dans l'un des trois bouillons, le résultat du patient était positif. Grâce à ce tableau, il est possible de calculer les valeurs de sensibilité et spécificité du test, de calculer la valeur prédictive positive ainsi que la valeur prédictive négative (Université d'Ottawa).

**SENSIBILITÉ** : C'est la probabilité de détecter le gène de résistance chez les patients porteurs de la bactérie. La sensibilité définie par la formule suivante :  $VP / VP + FN$

**SPÉCIFICITÉ** : C'est la probabilité de ne pas détecter le gène de résistance chez les patients non porteur de la bactérie résistante. La spécificité définie par la formule suivante :  $VN / VN + FP$

**VALEUR PRÉDICTIVE POSITIVE** : Elle indique la probabilité de détecter le gène de résistance soit réellement présent lorsque le résultat est positif. La VPP définie par la formule suivante :  $VP / VP + FP$

**VALEUR PRÉDICTIVE NÉGATIVE** : Elle indique la probabilité de ne pas détecter le gène de résistance soit réellement absent lorsque le résultat est négatif. La VPN définie par la formule suivante :  $VN / VN + FN$

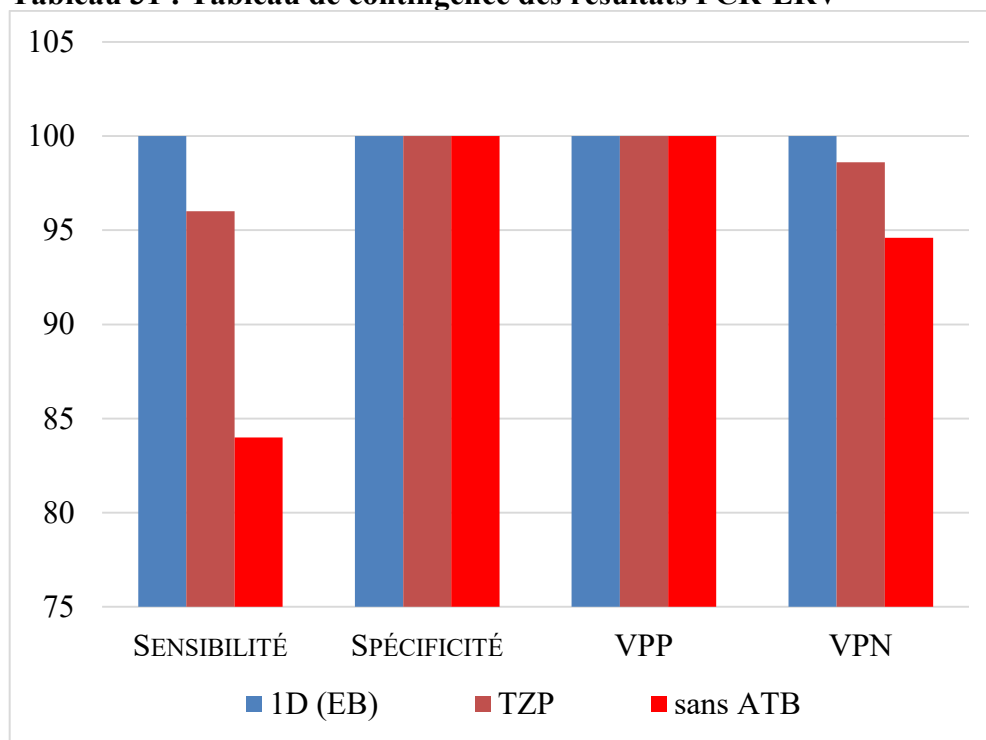
Les valeurs prédictives font références à la prévalence de la maladie selon le lieu. Par exemple, si la prévalence de la maladie est faible, avec une spécificité faible, il risque d'y

avoir plus de faux positifs que de vrai positif. Cependant, un résultat négatif où la prévalence est faible est précis (*The association of faculties of medicine of Canada*).

Les tableaux suivants définissent les valeurs de sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative. Quatre résultats ont été supprimés des calculs statistiques pour la validation du dépistage de l'ERV et cinq pour la validation du dépistage SARM dû à un problème méthodologique.

**Tableau 30 : Évaluation des résultats : PCR-ERV**

		CONTRÔLES	
		POSITIFS	NÉGATIFS
POSITIFS	TZP	24	0
	1D	25	0
	NEUTRE	21	0
NÉGATIFS	TZP	1	70
	1D	0	70
	NEUTRE	4	70

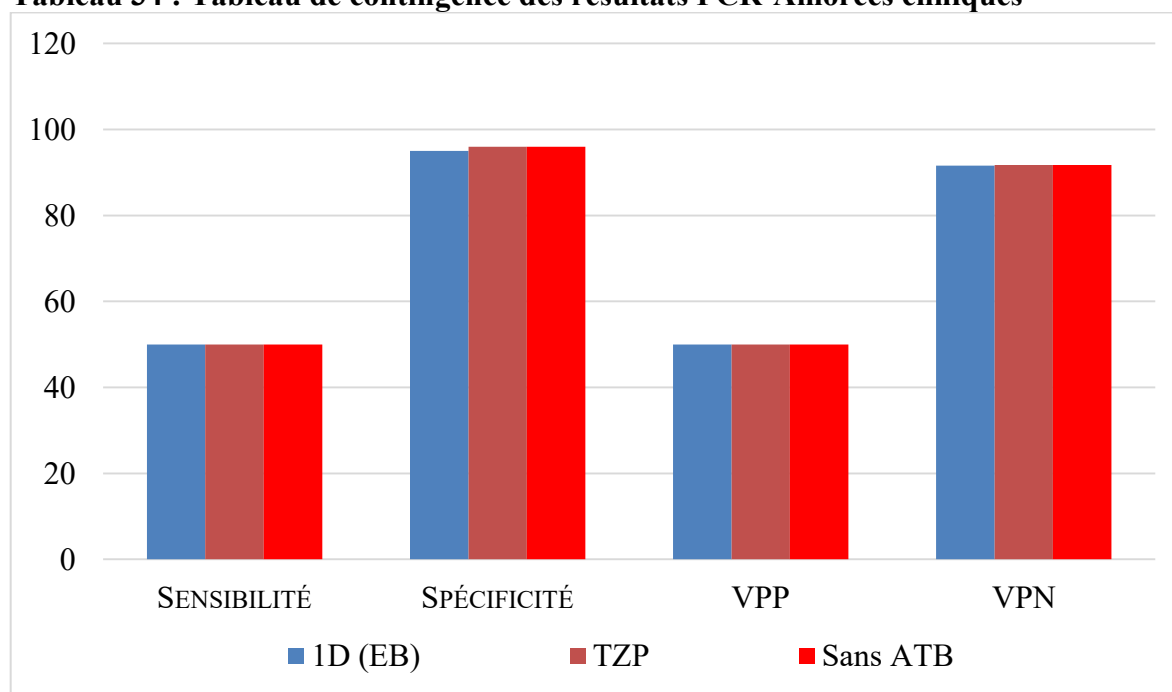
**Tableau 31 : Tableau de contingence des résultats PCR-ERV****Tableau 32 : Calculs valeurs statistiques des résultats PCR-ERV**

SENSIBILITÉ : $VP / VP + FN$	1D 100%	TZP 96,0%	NEUTRE 84,0%
SPÉCIFICITÉ : $VN / VN + FP$	1D 100%	TZP 100%	NEUTRE 100%
VALEUR PRÉDICTIVE POSITIVE : $VP / VP + FP$	1D 100%	TZP 100%	NEUTRE 100%
VALEUR PRÉDICTIVE NÉGATIVE : $VN / VN + FN$	1D 100%	TZP 98,6%	NEUTRE 94,6%

Sensibilité : Il est probable que la présence que d'autres bactéries dans le bouillon neutre aient profitées du temps de croissance du ERV qui est plus lent pour utiliser les ressources dans le bouillon de culture. Le bouillon neutre n'a pas été en mesure d'enrichir l'entérocoque contrairement aux deux autres bouillons qui ont inhibé la croissance des autres bactéries.

**Tableau 33 : Évaluation des résultats SARM : Détection par PCR-Amorces cliniques**

		CONTRÔLES	
		POSITIFS	NÉGATIFS
POSITIFS	TZP	7	3
	1D	7	4
	NEUTRE	7	3
NÉGATIFS	TZP	7	77
	1D	7	76
	NEUTRE	7	77

**Tableau 34 : Tableau de contingence des résultats PCR-Amorces cliniques**



**Tableau 35 : Calculs valeurs statistiques des résultats PCR-Amorces clinique**

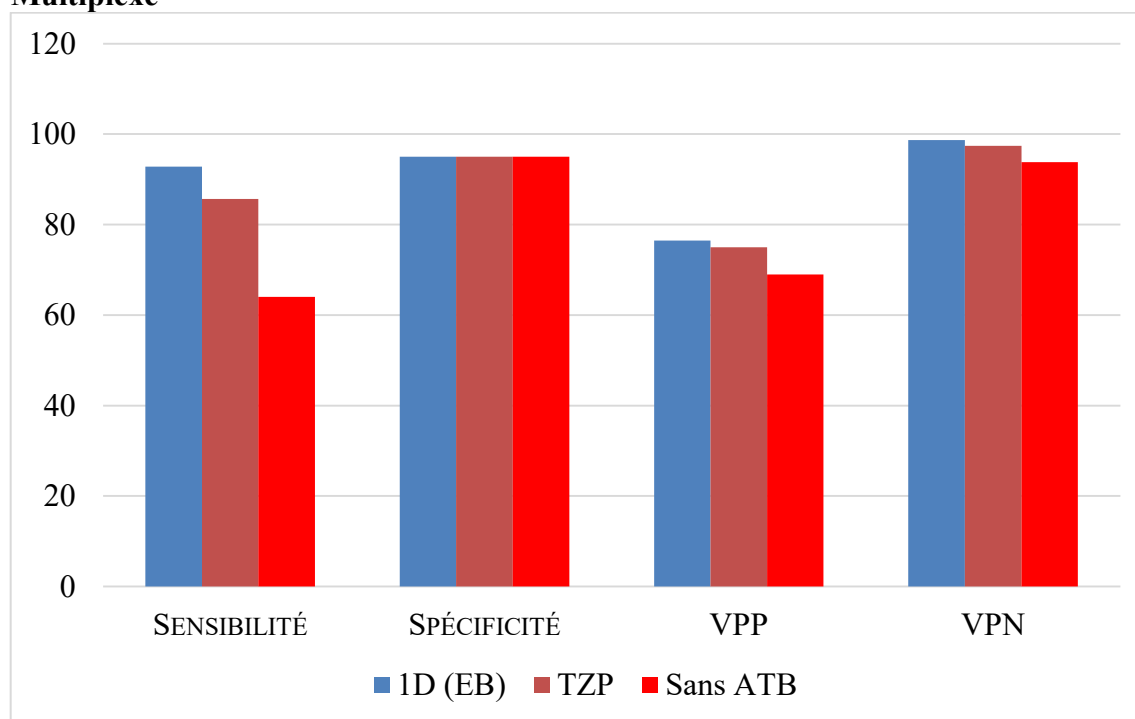
SENSIBILITÉ: $VP / VP + FN$	1D 50 %	TZP 50 %	NEUTRE 50 %
SPÉCIFICITÉ: $VN / VN + FP$	1D 95 %	TZP 96 %	NEUTRE 96 %
VALEUR PRÉDICTIVE POSITIVE: $VP / VP + FP$	1D 50 %	TZP 50 %	NEUTRE 50 %
VALEUR PRÉDICTIVE NÉGATIVE: $VN / VN + FN$	1D 91,6%	TZP 91,7 %	NEUTRE 91,7 %

50% des bouillons seront positifs au premier PCR mais n'auront pas la présence de la colonie.  
La prévalence de la maladie est faible auprès des patients recrutés.

**Tableau 36 : Évaluation des résultats SARM : Détection par PCR- Multiplexe**

		CONTRÔLES	
		POSITIFS	NÉGATIFS
POSITIFS	TZP	12	4
	1D	13	4
	NEUTRE	9	4
NÉGATIFS	TZP	2	76
	1D	1	76
	NEUTRE	5	76

**Tableau 37 : Tableau de contingence des résultats SARM : Détection par PCR-Multiplexe**



**Tableau 38 : Calculs valeurs statistiques des résultats SARM : Détection par PCR-Multiplexe**

SENSIBILITÉ : $VP / VP + FN$	1D 92,8 %	TZP 85,7 %	NEUTRE 64 %
SPÉCIFICITÉ : $VN / VN + FP$	1D 95 %	TZP 95 %	NEUTRE 95 %
VALEUR PRÉDICTIVE POSITIVE : $VP / VP + FP$	1D 76,5 %	TZP 75 %	NEUTRE 69 %
VALEUR PRÉDICTIVE NÉGATIVE : $VN / VN + FN$	1D 98,7 %	TZP 97,4 %	NEUTRE 93,8 %

Le bouillon et la PCR mis au point sont efficaces pour la détection des patients SARM et ERV. Le nouveau bouillon d'enrichissement 1D (13 bouillons sur 14) supporte mieux la croissance des SARM que les bouillons sans antibiotique (9 bouillons sur 14) et Tazocin (12 bouillons sur 14).

Parmi les 25 souches ERV identifiées lors du dépistage dans le nouveau bouillon, une seule souche n'a pas été détectée ni retrouvée dans le bouillon Tazocin (le bouillon de référence). De plus, 4 souches n'ont pas été détectées dans le bouillon sans ajout d'antibiotique. Nous développerons davantage cette analyse dans la section DISCUSSION, cependant, nous pouvons affirmer que notre nouvelle méthode de détection pourrait être utilisée avantageusement pour la détection simultanée du SARM et de l'ERV

## DISCUSSION

### 5.1 Rappel des objectifs du projet

Le principal objectif de ce projet de recherche était d'améliorer la détection des bactéries nosocomiales résistantes aux antibiotiques sur les échantillons de patients hospitalisés. Pour cela, le projet nécessitait de mettre au point une méthode de détection simultanée des SARM et des ERV dans le but de diminuer le temps et le coût liés à l'analyse. À cette fin, nous avons ;

- optimisé un nouveau bouillon d'enrichissement permettant la croissance concomitante de nos bactéries d'intérêt retrouvées dans le nez, l'anus et au niveau du rectum,
- conçu une nouvelle PCR en temps réel,
- validé notre nouveau bouillon,
- validé la nouvelle PCR.

Les résultats obtenus au cours de ce projet de maîtrise ont permis de rendre cela possible et la méthode développée est susceptible d'être intégrée dans un laboratoire clinique.

### 5.2 Optimisation du bouillon d'enrichissement

Lors des premiers essais, nous avons évalué la capacité des différents mélanges de bouillons d'enrichissement en utilisant diverses souches bactériennes. Aujourd'hui avec du recul, nous nous apercevons qu'une souche SARM aurait dû être incluse lors de ces analyses. Détail qui a été modifié lors de la seconde série d'analyse avec les selles. Cependant, cette omission nous assure que la souche *S. aureus* sensible ne pousse pas dans le bouillon d'enrichissement. Ce qui est une caractéristique importante de ce dernier.

Dans les essais effectués afin de déterminer la concentration minimale de bactérie SARM et/ou ERV sur un échantillon de patient, nous avons intensifié de 1000 fois la concentration des bactéries commensales et dont nous ne recherchons pas leur présence. La limite de la méthode a été contrôlée car nous avons été en mesure de détecter la présence de nos bactéries

SARM et ERV malgré la présence des entérobactéries ajoutées, et ce, aux mêmes concentrations que les bouillons analysés sans entérobactérie. (Voir section 4.1.2 tableau 15)

En examinant les résultats des CP obtenus pour chacun des bouillons développés dans ce projet, nous observons que les mélanges 2 et 2B sont les plus performants pour l'enrichissement du SARM (voir tableau 15). Cependant, pour la validation du bouillon, nous avons choisi d'utiliser le mélange 1D pour les raisons suivantes :

- Les mélanges 2 et 2B ont le désavantage d'être moins inhibiteurs de bactéries susceptibles de se retrouver au site de prélèvement et que nous souhaitons discriminer lors de l'enrichissement.
- En conservant l'aztréonam dans le mélange 1D, nous nous assurons d'une meilleure inhibition des entérobactéries présentes dans la flore intestinale (Wikler 2006).

En ce qui concerne les résultats des CP pour l'ERV qui sont illustrés au tableau 17, il n'y a pas de différences significatives pour les mélanges 1D, 2 et 2B. La bactérie n'est pas inhibée par la présence de l'aztréonam. Effectivement, tel que décrit dans l'article de Böcher *et al.* en 2008, la spécificité du test est améliorée lorsque la concentration de l'aztréonam est diminuée à 20 µg/mL ou moins. Même si la bactérie est résistante à l'antibiotique, nous avons remarqué le ralentissement de croissance de nos bactéries en bouillon, surtout chez le SARM.

Lors de nos expériences préliminaires, nous avons comparé notre bouillon avec le bouillon vancomycine (6µg/ml)-bile-esculine de la compagnie Oxoid. Le bouillon Oxoid est destiné à enrichir l'ERV et il est très largement utilisé pour la détection de ERV (Palladino *et al.*, 2003). Puisque notre bouillon d'enrichissement ne contient pas de vancomycine ni de bile, il est également possible de faire croître le SARM de manière concomitante. Il est particulièrement intéressant de noter que notre bouillon d'enrichissement inhibe la croissance du SARM. Bien qu'il n'inhibe pas la croissance de l'ERV, la PCR ne détecte pas sa croissance puisque notre PCR est spécifique au SARM et à l'ERV.

Selon des analyses préliminaires effectuées sur l'appareil Genexpert de Cepheid, nous avons comparé le bouillon d'enrichissement 1D (2µg/ml CTX + 10µg/ml ATM), le bouillon neutre et le bouillon commercial Vancomycine-bile-esculine de la compagnie Oxoid. Nous voulons

déterminer l'efficacité des bouillons pour la croissance de l'ERV. L'équivalent de 30 UFC/mL ont été ajoutées dans chacun des bouillons. Après une incubation *over night*, 20µL de bouillon a été analysé. Le bouillon 1D et neutre donnent 16,2 et 16,5 cycles contre 28,5 cycles pour le bouillon Oxoid. La valeur de CP du bouillon est inversement proportionnelle à la concentration bactérienne dans ce-dernier. Visiblement la croissance de l'ERV est ralentie dans le bouillon commercial, ce qui allonge le temps-réponse de l'analyse (il y a augmentation du temps d'incubation, ce qui retarde la sortie du rapport de laboratoire) et augmente les risques de sortir de faux résultats négatifs. Nous pouvons affirmer que le bouillon 1D est meilleur que le bouillon vancomycine-bile-esculine. Dans la littérature consulté, aucune autre équipe de recherche n'ont pas utilisé le mélange de céphalosporine (ex. : CTX) avec une monobactame (ex. : ATM). Le bouillon de référence avec tazocin inhibe les entérocoques à moins que celui-ci, dans de rare cas, produise une  $\beta$ -lactamase contre l'antibiotique (Wikler 2006).

De plus, selon le protocole de référence, il est nécessaire que le bouillon vancomycine-bile-esculine devienne noir (résultat positif) pour affirmer qu'il y a présence de bactéries. L'article de Werner *et al.*, 2011 qui concluait avoir obtenu un faible taux de détection après 18-28 h, ne précisait pas la proportion de bouillons noirs et de bouillons clairs analysés. Il ne semble pas qu'il avait extrait l'ADN des bouillons d'enrichissement clairs. Hors, en faisant l'extraction de l'ADN des bactéries présentes dans le bouillon vancomycine-bile-esculine même si celui-ci n'avait pas viré au noir, nous avons observé que l'entérocoque pouvait être détecté dans le milieu, ce qui pourrait expliquer le faible taux de détection d'ERV après 18-28h de Werner. Nos résultats tout comme ceux présentés par Böcher *et al.*, 2008-2010, Van Heirstraeten *et al.*, 2009 et Thomas J. Novicki *et al.* 2004, indiquent que le pré-enrichissement des spécimens dans un bouillon de culture permet une meilleure sensibilité de la méthode de détection. Nous considérons donc qu'il n'est pas nécessaire d'avoir une incubation de 42 à 52 h pour la détection des spécimens positifs.

Notre méthode de détection nécessite un pré-enrichissement du bouillon d'enrichissement conçu pour faire croître le SARM et l'ERV tout en inhibant la croissance des bactéries présentes sur l'échantillon du patient et qui pourraient nuire à la détection de nos bactéries d'intérêt. En se référant au tableau 15, Résultats par PCR avec amorces SARM, de la section

4.1.2, nous remarquons au bouillon 1D qu'il est nécessaire de faire le pré-enrichissement. La valeur des CP post-incubation sont nettement plus bas ce qui indique l'augmentation de la concentration bactérienne lors de l'incubation. De résultats négatifs (pré-incubation), nous obtenons un résultat clairement positif, c'est-à-dire, présence de SARM dans le spécimen.

Les articles cités à la section 1.6, les auteurs affirment que le pré-enrichissement améliore la détection de la bactérie.

Afin de l'imiter la croissance des entérobactéries de la flore, l'ajout d'antibiotique est également nécessaire dans la composition d'un bouillon d'enrichissement. Il s'agit du principe même de la notion de milieu de culture sélectif. Les résultats des analyses préliminaires démontrent bien cette notion. Nous notions la présence d'entérobactéries sur nos géloses sous-cultivées des bouillons où il n'y avait pas d'agent sélectif. (Voir résultats section 4.1.2)

### **5.3 Optimisation de la PCR multiplexe**

La classification des souches SARM est incomplète et non-standardisée. Les chercheurs nomment leurs souches avec leur propre classification, suivant leur propre nomenclature. En se référant la base de données du NCBI, nos amorces SARM permettent entre autres, l'amplification de différentes souches suivantes :

- SCCmec II, III, IV, IVn, IVg, V, X, IX, XI;
- souches SA40TW, OC8, NA45, DY39, V521, ZJ5499, NW32, 5118N, 1625 CO1, 1969N, 1971 CO1, BC05211.

Notre méthode permet la croissance en bouillon du SARM et de l'ERV simultanément, et ensuite faire la détection par PCR, simultanément avec le même extrait d'ADN à partir du bouillon et avec le même programme d'amplification. Cependant, l'analyse des gènes spécifiques à SARM et à ERV doit se faire dans deux puits PCR distinct. En effet, nous n'avons pas été en mesure de faire un multiplexe PCR amplifiant et détectant le SARM et l'ERV puisque les amorces, les sondes et les amplicons interagissaient entre eux affectant ainsi l'efficacité de la PCR. Il est possible d'avoir les résultats 24hrs après l'arrivée du spécimen au laboratoire clinique. Le bouillon d'enrichissement suivit de l'analyse PCR

permet de faire la sous-culture sur géloses chromogéniques des bouillons dont nous avons détecté la présence du gène spécifique au *S. aureus* (*nuc*) et du gène de résistance à la méticilline (*mecA*). Lors de la seconde journée, à lieu la confirmation par PCR de la colonie représentative du SARM. Toutefois, il est possible de faire l'analyse sur la même plaque PCR sous les mêmes conditions d'analyse.

#### **5.4 Validation du bouillon d'enrichissement**

Afin de faire la validation du bouillon d'enrichissement, nous avons utilisé de vrais spécimens de patient. Avant de solliciter la participation des bénéficiaires, nous avons présenté notre projet à deux comités d'éthique : CÉR du CRC CHUS et du CSSS Richelieu-Yamaska. Les certificats des comités d'éthique (voir ANNEXE IV) nous ont permis de rencontrer des patients hospitalisés dans trois centres référés : CHUS site Fleurimont et Hôtel-Dieu, Hôpital Honoré-Mercier et les centres de soins desservis par l'IUGS.

La validation du bouillon d'enrichissement a été élaborée en fonction du seul échantillon de patient reçu. Compte tenu de cet élément, nous croyons que l'ensemencement des bouillons a permis de répartir équitablement la concentration bactérienne présent dans l'échantillon. Après l'incubation des bouillons, l'extraction de leurs ADN et l'analyse avec la PCR de référence, nous avons ensemencé tous les bouillons, sur géloses, pour définir de notre standard de référence. La bactérie devait être retrouvée sur gélose à partir de l'un des trois bouillons pour définir l'état positif (ou négatif) de l'échantillon. Cependant, cette étape de recherche de la colonie spécifique à SARM ou à ERV, nous a occasionné plusieurs difficultés. Mentionnons, par exemple, notre difficulté à faire croître les souches ERV sur les géloses Bile-Esculine-agar et les géloses au sang que nous avons dû diviser en deux ou trois, par souci d'économie. À cette étape, l'utilisation des géloses chromogéniques aurait grandement améliorée la réalisation. Cependant il ne faut pas choisir la compagnie au hasard, effectivement tel que rapporté par Malhotra-Kumar *et al.*, en 2010, certaines compagnies offrent un produit plus sensible et plus spécifique. De plus, certaines cassettes staphylococciques ne sont pas détectées par les géloses (Malhotra-Kumar *et al.*, 2010).



## 5.5 Validation de la PCR

Puisqu'il est question ici de la validation de la PCR, il est nécessaire de d'introduire certaines complications liées à l'extraction des bouillons. Effectivement, la méthode d'extraction utilisée lors des essais et de la validation pourrait être une source d'erreur qui a nui à l'étude. En effet, cette méthode par lyse-alkaline ne permet pas la purification de l'ADN. Plusieurs problèmes méthodologiques peuvent être liés à cette technique d'extraction. Notamment, il peut y avoir la perte du culot d'ADN lors de l'extraction. En examinant les résultats obtenus lors de la validation du bouillon, spécimens 124, 125, 142, 203, 301 et 303, nous ne détectons pas l'ADN du SARM mais nous retrouvons la colonie dans la sous-culture d'un ou des trois bouillons comparés. S'agit-il d'une perte du culot lors de l'extraction ? Y-a-t'il eut un agent inhibiteur dans la réaction PCR ? Il est à noter également que notre technique d'extraction d'ADN (par lyse alcaline) ne permet pas sa purification. Par exemple, les bouillons d'enrichissement vancomycine (6µg/ml)-bile-esculine contiennent du fer, ce qui inhibe la réaction PCR. La purification de l'ADN contenu dans ces bouillons permettrait plus facilement la comparaison entre notre bouillon et celui de la compagnie Oxoid.

Si nous observons les résultats obtenus lors de la validation du bouillon d'enrichissement. Pour la croissance de l'ERV, le bouillon d'enrichissement 1D a une sensibilité de 100% contre la sensibilité de 84% du bouillon neutre. 4 spécimens patients sont de faux négatif contre 0 pour le bouillon 1D. Ce qui suggère que le bouillon 1D, en inhibant les bactéries nuisibles au dépistage du SARM et de l'ERV, permet à ces-dernières de croître plus rapidement que dans un bouillon sans antibiotique. En ce qui concerne les résultats pour la validation du bouillon d'enrichissement couplé à notre PCR, la sensibilité pour le SARM est de 92,8% et 95% pour la spécificité. Cependant, la méthode d'extraction de l'ADN est une méthode maison qui peut entraîner de faux résultats négatifs, si par exemple, le culot d'ADN est perdu lors de la technique. De plus, l'utilisation d'une gélose de type chromogénique permettrait de cibler plus facilement et plus rapidement les colonies recherchées.

## 5.6 Comparaison des méthodes

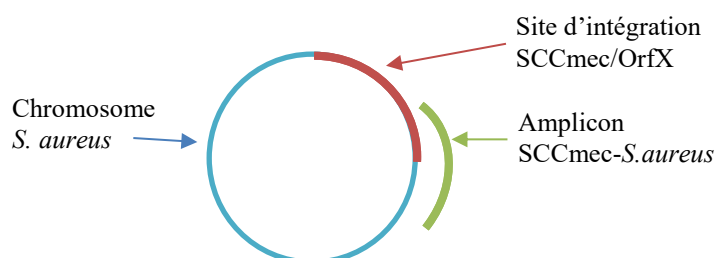
Considérant qu'il n'existe pas à ce jour de bouillon d'enrichissement permettant la croissance du SARM et de l'ERV simultanément ni d'analyse PCR permettant leur détection

concomitante, il n'est donc pas possible de faire la comparaison entre notre bouillon et ce qui se retrouve dans la littérature. Cependant, nous sommes en mesure de comparer notre méthode avec les méthodes destinées à détecter individuellement l'un ou l'autre de ces pathogènes.

En comparant notre méthode d'analyse avec les géloses chromogéniques (employées seules) disponibles sur le marché, le pré-enrichissement en bouillon de culture permet, selon la littérature citée, d'augmenter de 25% les chances de détection des gènes recherchés. (Van Heirstraeten *et al.*, 2009). D'un point de vue clinique, les géloses chromogéniques améliorent le temps-réponse de l'analyse. Elles diminuent également les coûts de celle-ci. Tout dépend de notre centre d'intérêt. Est-ce qu'il est plus important d'économiser des frais ou faut-il plutôt mettre le patient au centre de nos préoccupations ? De plus, dans le cadre de mon travail, il m'a été possible de constater que certaines géloses chromogéniques (Oxoid) permettaient également la croissance de colonies non-SARM. (Nahimana, *et al.* 2006) Une combinaison de notre méthode de dépistage couplée à une gélose de type chromogénique augmente la sensibilité et la spécificité du test. Cet aspect n'a pas été validé avec notre approche car au moment de faire l'étude, les géloses chromogéniques venaient de faire leur apparition sur le marché. Elles n'étaient pas aussi performantes que les nouvelles générations retrouvées aujourd'hui. Très peu de laboratoires cliniques dont celui du CHUS, en faisaient l'usage. Selon un schéma d'action prédéfini avec les responsables du laboratoire clinique de référence, la confirmation par PCR de la gélose chromogénique peut être abandonnée s'il s'agit, par exemple, d'un dépistage chez un patient déjà connu porteur du SARM.

Discuté précédemment à la section 1.3.4, la trousse de détection Crystal MRSA ID de la compagnie BD est une alternative pour les laboratoires cliniques qui n'ont pas accès à un PCR ou que le volume d'analyse ne justifie pas l'achat de ce type d'appareil. L'évaluation de cette trousse effectuée par Knepp *et al.*, en 1994, rapporte que 96% des souches *S. epidermidis* résistants à la méticilline ont été détectées par cette trousse. Il est donc nécessaire de faire l'identification du *S. aureus* avant l'utilisation de cette méthode diagnostic. En comparaison, notre méthode, bien qu'utilisée avec un thermocycleur, permet l'identification du *S. aureus* et de son gène de résistance lorsque présent.

Actuellement les trousse PCR retrouvées sur le marché détectent le site d'intégration de la cassette SCCmec au niveau de l'OrfX, (Huletsky *et al.*, 2004) et une partie de l'amplicon produit par les amorces de ces trousse inclus une séquence d'ADN de la bactérie *S. aureus* sensible aux antibiotiques. (Figure 20) De cette façon, la compagnie s'assure d'avoir amplifié le gène de la résistance à la méticilline ainsi que le *S. aureus*. L'avantage avec cette méthode de dépistage, c'est qu'il n'est pas nécessaire de sous-cultiver le bouillon d'enrichissement et de confirmer la présence d'un vrai SARM. Le problème avec cette méthode, c'est qu'il est possible de retrouver l'intégration de la cassette SCCmec à un autre site dans le chromosome bactérien. (Hill-Cawthorne *et al.*, 2014) De plus, ces amorces commerciales n'amplifient pas la souche SCCmec XI (*mecC*).



**Figure 20 : Schéma stratégie d'amplification des trousse commerciales**

Concernant notre PCR multiplexe SARM, celui-ci détecte la présence du gène *nuc*, spécifique au *S. aureus*, détecte la présence du gène *mecA* correspondant au gène de résistance à la méticilline ainsi que la présence du gène *mecC* correspondant à la nouvelle souche retrouvée en Europe. Le multiplexe emploie des sondes spécifiques au gène *nuc* et *mecA* et un mésappariement avec la souche ayant le gène *mecC*. Ce mésappariement entre la sonde *mecA* et l'ADN de la souche *mecC* se révèle par une température de dénaturation (TM) plus basse que le bon appariement de la sonde *mecA* avec l'ADN de la souche *mecA*. Une différence d'environ 5°C permet de faire la distinction entre les deux souches.

Bien que les gélases chromogéniques soient plus abordables que n'importe quelle PCR, notre méthode de détection est toutefois moins chère que certaines techniques retrouvées sur le marché.

Il existe des méthodes de détection par cartouche PCR. Ces cartouches sont rapides, simple d'utilisation, mais surtout très cher. Une seule cartouche coûte au moins 35\$. La compagnie Cepheid (CA, É-U) vend ces cartouches pour la détection de différentes espèces bactériennes

notamment le SARM, SARM-AC et l'ERV. Le produit de détection de l'ERV identifie le gène *vanA* et le gène *vanB*. Ces cartouches sont simples, faciles d'utilisation qui permettent l'extraction de l'ADN et l'amplification du gène de d'intérêt, mais surtout très onéreuses. L'utilisation d'un appareil de la compagnie Cepheid avec différentes cartouches peut-être utile pour un petit centre hospitalier. Cependant, pour faire le dépistage d'un centre universitaire, ceci augmente considérablement les frais. Notre méthode d'analyse SARM se détail autour de 17\$ par analyse et environ 20 à 22\$ si nous ajoutons la détection de l'ERV. La méthode de référence coûte 17\$ pour l'analyse du SARM et de 6\$ pour l'analyse de l'ERV. Par contre, contrairement à la méthode ERV de référence, notre méthode permet d'avoir un temps-réponse plus rapide. Notre méthode prend environ 48h pour obtenir un résultat positif contre plus de 72h si nous utilisons la méthode ERV de référence. De plus, contrairement à notre méthode, ces cartouches ne détectent pas la présence du gène *mecC*.

Jusqu'à ce jour, une seule compagnie détecte la présence de la nouvelle souche *mecC*. Les trousse commerciales, pour la recherche du SARM, ne permettent pas la détection de la souche *mecC*. Seule la compagnie Vela diagnostics (Fairfield, NJ, É-U.) offre une PCR qui permet son dépistage. Malheureusement, il n'y a pas de distributeur au pays. Et comme l'indique la note en bas de page de ce communiqué, cette trousse n'est pas disponible aux États-Unis.

L'autre avantage que ces trousse permettent de constater, c'est qu'il est possible de faire l'analyse rapidement après l'arrivée du spécimen du patient au laboratoire clinique. La compagnie Roche Diagnostics vend une trousse où l'échantillon du patient est mis directement dans une solution d'extraction au SDS (dodécylsulfate de sodium) qui permet la dénaturation des protéines présentes dans le spécimen. Le tube de solution de SDS est mis à bord du Cobas® 4800 (robot pipetteur de la compagnie Roche Diagnostics) où celui-ci débute la préparation de la plaque d'analyse en vue de l'analyse par PCR. Bien que le dépistage de la bactérie soit plus rapide, la solution de SDS ne permet pas la croissance du SARM afin d'avoir une meilleure détection de la bactérie contrairement à notre bouillon d'enrichissement. Actuellement la compagnie met au point une trousse similaire pour la détection de l'ERV.

Concernant la trousse disponible pour la détection du SARM, pour être en mesure de dépister l'ensemble des souches SARM (nosocomiales et acquis en communauté), l'utilisation d'au moins deux cartouches est nécessaire. De plus, est-il possible de combiner plusieurs sites de prélèvement dans une même cartouche PCR ? Certainement, mais l'homologation Santé Canada n'a pas été réalisé dans ce sens. Bien que notre méthode n'ait pas été homologué Santé Canada, elle permet toutefois de regrouper les spécimens dans le même bouillon d'enrichissement. Ce qui est en soit une économie d'argent.

Certains résultats obtenus sont négatifs contrairement aux résultats escomptés. Cependant, tous les cas qui devaient être positifs (chez les participants hospitalisés au CHUS) ont été confirmés négatifs par le laboratoire de microbiologie clinique. Mentionnons que le Service de prévention et contrôle des infections (PCI) lève les précautions d'isolement lorsqu'un bénéficiaire *reçoit* trois résultats négatifs consécutifs (absence de SARM ou absence d'ERV) : démarche qui permet sans doute d'éviter les erreurs de prélèvement, les erreurs de bénéficiaire, des erreurs techniques du laboratoire ou la diminution temporaire de la charge bactérienne en dessous du seuil de détection.

## 5.7 Biais

Cette étude a pour but de développer et de valider un nouveau bouillon d'enrichissement du SARM et de l'ERV, ainsi que de développer et valider un PCR multiplex qui détecte ces 2 pathogènes. Ce bouillon a été comparé aux bouillons actuellement utilisés par le laboratoire clinique. Il y avait un risque que le second prélèvement (recueilli par l'équipe de recherche) ne contienne pas le même nombre de bactéries que le prélèvement initial. Cela peut affecter les résultats obtenus par l'équipe de recherche. Cependant, puisque le second prélèvement a été recueilli plusieurs jours après le premier prélèvement, nous pouvons considérer que ce biais est négligeable. Notons que les bactéries commensales ont la capacité de se reproduire rapidement.

Un second biais a été observé lors de la validation du bouillon d'enrichissement, c'est l'utilisation d'antibiotiques chez nos participants volontaires. En effet, le recrutement des volontaires a été difficile à réaliser, notamment pour recueillir des souches ERV. Il était également difficile de contrôler la prise de médicament. Malgré la prise d'antibiotique, nous

avons remarqué que peu d'effet sur les résultats escomptés. Les souches bactériennes recherchées lors de notre étude résistent à la majorité des antibiotiques présents dans la liste décrite plus haut.

Il est toutefois à considérer que lors de l'admission du patient aux soins de santé, celui-ci peut avoir une couverture antibiotique qui pourrait fausser les résultats du dépistage.

## 5.8 Conclusions

Le bouillon d'enrichissement que nous avons conçu s'avère aussi efficace que les bouillons SARM et ERV tout en innovant parce qu'il permet la croissance des 2 bactéries simultanément.

Notre procédure prend plus de temps (1 jour de plus), mais est plus sensibles que les techniques commerciales 1) pour les souches de génotypes non-conventionnelles ou pour les souches mutantes ; 2) pour les patients porteurs de bactéries en faible quantité ou, dans le cas des SARM, des patients porteurs seulement au niveau rectal. Notre procédure permet de récupérer la souche de bactérie pour confirmation, pour génotypage et pour la détermination de la sensibilité à d'autres antibiotiques. Dans notre étude nous avons recruté des patients souvent connus porteurs sur un prélèvement en admission, mais leur statut pourrait avoir changé lors des traitements antibiotiques qui accompagnent la plupart des hospitalisations. Certains traitements (la minorité) auront éliminé SARM et ERV, tandis que d'autres traitements auraient amplifié une charge bactérienne faible et compromis la santé du patient. De plus, cette méthode de dépistage maison permet la réduction des coûts associés aux frais d'isolement du patient et à la réduction des coûts d'analyse.

## 5.9 Perspectives

Le plan de formation initial introduisait l'automatisation de la méthode sur un robot pipetteur. Le robot aurait rendu l'extraction de l'ADN beaucoup plus simple pour le technicien(ne) tout en épargnant les blessures dues aux gestes répétitifs causés par cette méthode. Le robot aurait également permis la confection de la plaque PCR en préparant les *mastermix* et délivrant l'ADN recueilli de façon plus précise que le technicien. Ce volet n'a pas été réalisé pour des raisons de budget et d'accès à une plateforme automatisable. Cependant, s'il avait été

possible d'automatiser la méthode, le coût technique rendant l'analyse plus abordable. De plus, ces plateformes peuvent s'adapter à différentes analyses exécutées par le laboratoire clinique. Ce qui rentabilise l'achat de ce type d'appareil.

De plus, le projet de recherche aurait pu se prolonger facilement. Plusieurs améliorations de la PCR auraient pu être fait afin d'augmenter l'efficacité de celle-ci. Un contrôle interne introduit au moment de l'extraction était envisagé. Grâce à une souche d'*Escherichia coli* porteur d'un segment d'ADN spécifique, il aurait été possible de s'assurer de l'efficacité et la performance de l'analyse. L'introduction d'un contrôle interne au moment de l'extraction de l'ADN jusqu'à l'analyse de la courbe de dénaturation, permet d'évaluer la présence d'un inhibiteur durant la PCR. Il permet également de s'assurer que le spécimen patient a bien été mis lors de la conception de la plaque PCR. Celui-ci évite surtout les faux négatifs.

En plus du contrôle interne, la possibilité d'introduire le dépistage du gène de la PVL pourrait faire l'objet d'une amélioration. Nous avons actuellement les amorces disponibles pour en faire l'analyse. Cependant, nos amorces et sondes SARM permettent la détection des souches SARM-AC sans toutefois différencier les deux lignées.

Et finalement, dans le souci de réduire le temps-réponse du dépistage, un projet intégrant les géloses chromogéniques pourrait être une amélioration de l'analyse.

## REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier Dr Eric Frost pour m'avoir fait confiance dans cette aventure. Vous m'avez toujours encouragé et soutenu dans les moments difficiles. J'apprécie énormément nos discussions sur les différentes problématiques rencontrées au laboratoire. Merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire de m'avoir donné ma chance.

Je remercie également Sylvie Deslandes pour ses conseils, ses encouragements et l'aide technique qu'elle m'a apportée dans la réalisation de ce projet. Malgré le peu de temps passé ensemble au laboratoire, tu as toujours eu la gentillesse de répondre à mes questions. Tu m'as inspirée le sens de la rigueur ce qui me suivra tout au long de ma carrière.

Merci aux membres de mon jury d'évaluation, Dr Nancy Dumais et Dr Alfredo Menendez.

Merci à mes bons amis Geneviève Giroux, Patrick D Paquette, Laurie Vingataramin et Karine Bourgade, avec qui j'ai passé de très belles années au laboratoire de recherche. Je souhaite que nos chemins se recroisent à nouveau dans l'avenir et que nous ayons la chance de retravailler ensemble. J'aimerais également remercier les technologistes médicales du laboratoire clinique pour votre aide, ainsi qu'à toutes les personnes du département de microbiologie-infectiologie qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement ma maîtrise.

Merci à ma famille pour votre support et vos encouragements, c'est presque fini ! Finalement, je tiens à remercier mon conjoint et ami Kevin qui a toujours cru en moi. Tu as toujours su trouver les mots pour m'aider à me raccrocher à ce projet ambitieux. À mon bébé Edouard, je serai beaucoup plus présente pour toi à l'avenir.



## LISTE DES RÉFÉRENCES

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990).** Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- Ameziane, N., Bogard, M., Lamoril, J., & Gougerot-Pocidallo, M. A. (2005).** Principes de biologie moléculaire en biologie clinique. Campus référence. ISO 690
- Apajalahti, J. H., Särkilahti, L. K., Mäki, B. R., Heikkinen, J. P., Nurminen, P. H., & Holben, W. E. (1998).** Effective recovery of bacterial DNA and percent-guanine-plus-cytosine-based analysis of community structure in the gastrointestinal tract of broiler chickens. *Applied and environmental microbiology*, 64(10), 4084-4088.
- Arbique, J., Forward, K., Haldane, D., & Davidson, R. (2001).** Comparison of the Velogene Rapid MRSA identification assay, Denka MRSA-Screen assay, and BBL Crystal MRSA ID system for rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 40(1), 5-10.
- Association of faculties of medicine of Canada : Site WEB consulté le 2017-05-10**  
<http://phprimer.afmc.ca/Part2-MethodsStudyingHealth/Chapitre6LesMthodesMesurerLaSant/Linterprtationdetestssurdespersonnes>
- BLAST (Logiciel): Basic Local Alignment Search Tool (NCBI): Comparaison des séquences d'ADN** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
- Böcher, S., Gervelmeyer, A., Monnet, D. L., Mølbak, K., & Skov, R. L. (2008).** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: risk factors associated with community-onset infections in Denmark. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(10), 942-948.
- Böcher, S., Skov, R. L., Knudsen, M. A., Guardabassi, L., Mølbak, K., Schouenborg, P. & Westh, H. (2010).** The search and destroy strategy prevents spread and long-term carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: results from the follow-up screening of a large ST22 (E-MRSA 15) outbreak in Denmark. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(9), 1427-1434.
- Boundy, S., Safo, M. K., Wang, L., Musayev, F. N., O'Farrell, H. C., Rife, J. P., & Archer, G. L. (2013).** Characterization of the *Staphylococcus aureus* rRNA methyltransferase encoded by orfX, the gene containing the staphylococcal chromosome Cassette mec (SCCmec) insertion site. *Journal of Biological Chemistry*, 288(1), 132-140.
- Boyle-Vavra, S., & Daum, R. S. (2007).** Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton–Valentine leukocidin. *Laboratory investigation*, 87(1), 3-9.

**Brown, D. F., Edwards, D. I., Hawkey, P. M., Morrison, D., Ridgway, G. L., Towner, K. J., & Joint Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. (2005).** Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(6), 1000-1018.

**Brown DF, Walpole E. (2001)** Evaluation of the Mastalex latex agglutination test for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* grown on different screening media. *J Antimicrob Chemother*; 47: 187–9

**Bush, K & A. Bradford, P, Cold Spring Harb Perspect Med 2016;6:a025247**

**Cabeen, M. T., & Jacobs-Wagner, C. (2005).** Bacterial cell shape. *Nature Reviews Microbiology*, 3(8), 601-610.

**Castillo-Rojas G, Mazari-Hiriart M, Ponce de León S, et al.(2013)** Comparison of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Strains Isolated from Water and Clinical Samples: Antimicrobial Susceptibility and Genetic Relationships. Ibekwe AM, ed. *PLoS ONE*. 2013;8(4):e59491. doi:10.1371/journal.pone.0059491.

**Cepheid : Documents disponibles sur le site de la compagnie :**

[http://www.cepheid.com/administrator/components/com\\_productcatalog/library-files/bc1492b7e0b5d2ba8e298b06646c0a32-Xpert-MRSASA-BC-DATASHEET-0419-01.pdf](http://www.cepheid.com/administrator/components/com_productcatalog/library-files/bc1492b7e0b5d2ba8e298b06646c0a32-Xpert-MRSASA-BC-DATASHEET-0419-01.pdf)

[http://www.cepheid.com/administrator/components/com\\_productcatalog/library-files/6319f8b0a3c7a85f3ccd051c06cf94d0-Xpert-MRSA-SA-SSTI-US-Brochure-0257-04.pdf](http://www.cepheid.com/administrator/components/com_productcatalog/library-files/6319f8b0a3c7a85f3ccd051c06cf94d0-Xpert-MRSA-SA-SSTI-US-Brochure-0257-04.pdf)

**Cetinkaya, Y., Falk, P., & Mayhall, C. G. (2000).** Vancomycin-resistant enterococci. *Clinical microbiology reviews*, 13(4), 686-707.

**Chambers, H. F., & DeLeo, F. R. (2009).** Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature reviews. Microbiology*, 7(9), 629.

**Chapot-Chartier, M. P., & Kulakauskas, S. (2014).** Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microbial cell factories*, 13(1), S9.

**Clark, L.W., Garrett, P.E., Martin, R. et Meier, K.L. (2002)** User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline. *NCCLS* Volume 22 Number 14.

**Clayton, D. A. (1982).** Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*, 28(4), 693-705.

**ClustalW Multiple Alignment du logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor**  
<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

**Courvalin, P. (2006).** Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clinical Infectious Diseases*, 42(Supplement 1), S25-S34.

**Cuny, C., & Witte, W. (2005).** PCR for the identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains using a single primer pair specific for SCCmec elements and the neighbouring chromosome-borne orfX. *Clinical microbiology and infection*, 11(10), 834-837.

**DINAMelt; DI-Nucleic Acid hybridization and melting prediction: (Version 3.6)** Site WEB consulté le 2016-04-15 <http://unafold.rna.albany.edu/?q=dinamelt>

**Espy, M. J., Uhl, J. R., Sloan, L. M., Buckwalter, S. P., Jones, M. F., Vetter, E. A., Yao, J. D., Wengenack, N. L., Rosenblatt, J. E., Cockerill, F. R., 3rd et Smith, T. F. (2006).** Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical microbiology reviews*, volume 19, numéro 1, p. 165-256

**Facklam, R. R. (1972).** Recognition of group D streptococcal species of human origin by biochemical and physiological tests. *Applied microbiology*, 23(6), 1131-1139.

**Farmer, J. J., Carter, G. P., Miller, V. L., Falkow, S., & Wachsmuth, I. K. (1992).** Pyrazinamidase, CR-MOX agar, salicin fermentation-esculin hydrolysis, and D-xylose fermentation for identifying pathogenic serotypes of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of clinical microbiology*, 30(10), 2589-2594.

**Huletsky, A., Giroux, R., Rossbach, V., Gagnon, M., Vaillancourt, M., Bernier, M., ... & van Belkum, A. (2004).** New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of *Staphylococci*. *Journal of clinical microbiology*, 42(5), 1875-1884.

**Hartman, B. J., & Tomasz, A. L. E. X. A. N. D. E. R. (1984).** Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 158(2), 513-516.

**Hill-Cawthorne, G. A., Hudson, L. O., El Ghany, M. F. A., Piepenburg, O., Nair, M., Dodgson, A & Pain, A. (2014).** Recombinations in staphylococcal cassette chromosome mec elements compromise the molecular detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, 9(6), e101419.

**Institut national de santé publique du Québec (INSPQ)** Prévention et contrôle des infections nosocomiales: Plan d'action 2010-2015. Québec: Gouvernement du Québec. <http://publications.msss.gouv.qc.ca/acrobat/f/documentation/2010/10-209-04.pdf>  
Document consulté le 2015-03-16

**Institut national de santé publique du Québec (INSPQ)** Mesures de prévention et de contrôle des infections à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) au Québec Québec: Gouvernement du Québec. <https://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/489-MesuresPreventionControleSARM.pdf>

**Integrated DNA Technologies (IDT) : User Guides and Protocols.**

Document disponible sur le site WEB d'IDT consulté le 2016-04-15

<http://www.idtdna.com/pages/docs/default-source/user-guides-and-protocols/user-guide-rnasealert.pdf?sfvrsn=8>

**Integrated DNA Technologies (IDT) : The polymerase-chain-reaction**

Document disponible sur le site WEB d'IDT consulté le 2016-04-15

<http://www.idtdna.com/pages/docs/educational-resources/the-polymerase-chain-reaction.pdf?sfvrsn=4>,

**Integrated DNA Technologies (IDT) : A basic PCR protocol**

Document disponible sur le site WEB d'IDT consulté le 2016-04-15

<http://www.idtdna.com/pages/docs/educational-resources/a-basic-pcr-protocol.pdf?sfvrsn=5>

**Integrated DNA Technologies (IDT) : Site WEB consulté le 2016-04-15 :**

<http://www.idtdna.com/calc/analyzer>

**International Working Group on the SCC elements** site WEB consulté le 2016-02-15

<http://www.sccmec.org/>)

**Ito, T., Katayama, Y., Asada, K., Mori, N., Tsutsumimoto, K., Tiensasitorn, C., & Hiramatsu, K. (2001).** Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(5), 1323-1336.

**Kaplan, S. L. (2005).** Treatment of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *The Pediatric infectious disease journal*, 24(5), 457-458.

**Katayama, Y., Ito, T., & Hiramatsu, K. (2000).** A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(6), 1549-1555.

**Kim T, Oh PA, Simor AE. (2001).** The economic impact of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canadian hospitals. *Infect control Hosp Epidemiol*; 22:99-104.

**Knapp, C. C., Ludwig, M. D., & Washington, J. A. (1994).** Evaluation of BBL crystal MRSA ID system. *Journal of clinical microbiology*, 32(10), 2588-2589.

**Kuusela, P., Hilden, P., Savolainen, K., Vuento, M., Lyytikäinen, O., & Vuopio-Varkila, J. (1994).** Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains not identified by slide agglutination tests. *Journal of clinical microbiology*, 32(1), 143-147.

**Lévesque, S., Bourgault, A-M., Lef1Dvre et B., Grenier, S. (2010).** Surveillance des Souches de *Staphylococcus aureus* Résistantes à la Meticilline Isolées des Bactériémies dans la Province de Québec, Rapport 2009-2010. *Laboratoire de Santé Publique du Québec*. Rapport annuel

**Louie M, Simor AE, Szeto S, Patel M, Kreiswirth B, Low DE. (1992).** Susceptibility testing of clinical isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 30(1):41-45.

**Malhotra-Kumar, S., Abrahantes, J. C., Sabiiti, W., Lammens, C., Vercauteren, G., Ieven, M. & MOSAR wp2 study team. (2010).** Evaluation of chromogenic media for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*, 48(4), 1040-1046.

**Mediavilla, J. R., Chen, L., Mathema, B., & Kreiswirth, B. N. (2012).** Global epidemiology of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Current opinion in microbiology*, 15(5), 588-595.

**Medical library** <http://doctorlib.info/pharmacology/manual/54.html> Site Web consulté 2017-07-27

**Millar, B. C., Loughrey, A., Elborn, J. S., & Moore, J. E. (2007).** Proposed definitions of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Journal of Hospital Infection*, 67(2), 109-113.

**Murray, B. E. (1992).** Beta-lactamase-producing enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, volume 36, numéro 11, p. 2355-2359.

**Nahimana, I., Francioli, P., & Blanc, D. S. (2006).** Evaluation of three chromogenic media (MRSA-ID, MRSA-Select and CHROMagar MRSA) and ORSAB for surveillance cultures of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(12), 1168-1174.

**National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2000).** Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Fifth Edition (M7–A5). Vallanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards 7:25.

**National Center for Biotechnology Information (NCBI).** PubChem Compound Database; CID=14969, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=14969> Site consulté 2017-07-27

**Novicki, T. J., Schapiro, J. M., Ulness, B. K., Sebeste, A., Busse-Johnston, L., Swanson, K. M. & Limaye, A. P. (2004).** Convenient selective differential broth for isolation of vancomycin-resistant *Enterococcus* from fecal material. *Journal of clinical microbiology*, 42(4), 1637-1640.

**Perry, A. M., Ton-That, H., Mazmanian, S. K., & Schneewind, O. (2002).** Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus* III. Lipid II is an in vivo peptidoglycan substrate for sortase-catalyzed surface protein anchoring. *Journal of Biological Chemistry*, 277(18), 16241-16248.

**Otto, M. (2014).** *Staphylococcus aureus* toxins. *Current opinion in microbiology*, 17, 32-37.

**Palladino, S., Kay, I. D., Flexman, J. P., Boehm, I., Costa, A. M., Lambert, E. J. et Christiansen, K. J. (2003).** Rapid detection of vanA and vanB genes directly from clinical specimens and enrichment broths by real-time multiplex PCR assay. *Journal of clinical microbiology*, volume 41, numéro 6, p. 2483-2486.

**Pichon, B., Hill, R., Laurent, F., Larsen, A. R., Skov, R. L., Holmes, M. & Kearns, A. M. (2012).** Development of a real-time quadruplex PCR assay for simultaneous detection of nuc, Panton–Valentine leucocidin (PVL), mecA and homologue mecALGA251. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(10), 2338-2341.

**Sarti, M., Campanile, F., Sabia, C., Santagati, M., Gargiulo, R., & Stefani, S. (2012).** Polyclonal diffusion of beta-lactamase-producing *Enterococcus faecium*. *Journal of clinical microbiology*, 50(1), 169-172.

**Scheffers, D. J., & Pinho, M. G. (2005).** Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(4), 585-607.

**Skov, R., Christiansen, K., Dancer, S. J., Daum, R. S., Dryden, M., Huang, Y. C., & Lowy, F. D. (2012).** Update on the prevention and control of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *International journal of antimicrobial agents*, 39(3), 193-200.

**Skow, Á., Mangold, K. A., Tajuddin, M., Huntington, A., Fritz, B., Thomson, R. B., & Kaul, K. L. (2005).** Species-level identification of staphylococcal isolates by real-time PCR and melt curve analysis. *Journal of clinical microbiology*, 43(6), 2876-2880.

**Subrt, N., Mesak, L. R., & Davies, J. (2011).** Modulation of virulence gene expression by cell wall active antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(5), 979-984.

**Turlej, A. G. A. T. A., Hryniewicz, W. A. L. E. R. I. A., & Empel, J. O. A. N. N. A. (2011).** Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) classification and typing methods: an overview. *Pol J Microbiol*, 60(2), 95-103.

**Université d'Ottawa :** Site WEB consulté le 2017-05-09

[https://www.med.uottawa.ca/sim/data/Sensitivity\\_f.htm](https://www.med.uottawa.ca/sim/data/Sensitivity_f.htm)

**Vela Diagnostics :** Document disponible sur le site de la compagnie. Site WEB consulté le 2016-12-20

<http://www.veladx.com/news-reader/items/vela-diagnostics-launches-the-sentosa-sa-direct-mrsa-pcr-test-on-its-sentosa-automated-platform.html>

**Van Griethuysen, A., Pouw, M., van Leeuwen, N., Heck, M., Willemse, P., Buiting, A., & Kluytmans, J. (1999).** Rapid slide latex agglutination test for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*, 37(9), 2789-2792.

**Van Griethuysen A, Pouw M, vanLeeuwen N *et al.* (1999).** Rapid slide latex agglutination test for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*; 37: 2789–92

**Van Heirstraeten, L., Abrahantes, J. C., Lammens, C., Lee, A., Harbarth, S., Molenberghs, G. & MOSAR WP2 study group. (2009).** Impact of a short period of pre-enrichment on detection and bacterial loads of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from screening specimens. *Journal of clinical microbiology*, 47(10), 3326-3328.

**Werner, G., Serr, A., Schütt, S., Schneider, C., Klare, I., Witte, W. et Wendt, C. (2011).** Comparison of direct cultivation on a selective solid medium, polymerase chain reaction from an enrichment broth, and the BD GeneOhm™ VanR assay for identification of vancomycin-resistant enterococci in screening specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, volume 70, p.512-521.

**Wikler, M. A. (2006).** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Sixteenth informational supplement (Vol. 26). Clinical and Laboratory Standards Institute.

**ANNEXES I****VALIDATION DE LA PCR CLINIQUE SUR LE LC480 DE ROCHE  
DIAGNOSTICS**



## Validation de la PCR clinique sur le LC480 de Roche Diagnostics

### *Matériels & Méthodes*

L'objectif 4b est d'adapter la PCR fait en microbiologie clinique sur le carrousel LC 2.0 de Roche Diagnostics sur le LightCycler 480 Roche Diagnostic. Le laboratoire de microbiologie clinique du CHUS avait fait l'acquisition d'un nouvel appareil en janvier 2011, le LC 480 de Roche Diagnostics. Bien que les essais sur les amorces et les sondes ne fussent encore qu'au commencement, nous avons simplement adapté le programme PCR existant sur le nouvel appareil. Par la suite, un nombre important et significatif d'échantillon a été comparé par les deux méthodes avant de poursuivre à l'implantation de la nouvelle méthode au laboratoire et l'enseignement des technologistes qui seront responsables de la formation au sein du laboratoire

#### *– Ajustement des plateformes LC 2.0 et LC480*

Plusieurs essais ont été réalisés afin de déterminer la température d'hybridation des amorces ainsi que la concentration de chacune d'elles. Nous avons réalisé une série d'essais sur le LC 480 de 40 cycles où le temps d'hybridation fixé à 40 sec suivi d'une analyse de courbe de dénaturation (TM). Nous avons testé cinq températures différentes soit : 55°C, 58°C, 60°C, 62°C et 65°C. Nous avons également testé trois différentes concentrations d'amorces : 0,3µM, 0,45µM et 0,5µM. Ces essais ont été réalisés sur quatre espèces de staphylocoque : SARM, SASM, *S. epidermidis* (*mecA* positif) et *S. saprophyticus* et sur trois spécimens regroupés (pool) de patients cliniques.

### Exemple d'essai pour les ajustements de la PCR en temps réel sur le LC480

Conditions de la PCR: effectuée avec le thermocycleur LightCycler 480 II real-time PCR system de la compagnie Roche Diagnostics.

95°C [05 :00 min]

40 cycles (95°C [0:10 min], 55°C\* [0:40 min], 72°C [0:15 min])

95°C [01:00 min] (obtention de la courbe de dénaturation (T<sub>m</sub>))

60°C [1:00 min]

60°C à 90°C (à raison de 0,11°C/sec avec 5 acquisitions/°C)

40°C [0:10 min]

\*Selon la température testée.

Les milieux réactionnels de la PCR (avec les différentes concentrations d'amorces)

### Critères de positivité

#### – *Procédure sur le LC 2.0*

La procédure d'analyse clinique pour les SARM au moment de l'adaptation du nouvel appareil était réalisée en combinant (*pool*) les spécimens 3 x 3 afin d'effectuer le plus d'analyse sur le carrousel LC2.0 car celui-ci permet d'analyser seulement 32 échantillons par analyse. À cette étape de l'analyse, seules les amorces *nuc* étaient utilisées. Si le spécimen regroupé (*pool*) était positif, les échantillons étaient ré-extraits séparément et ré-analysés avec les amorces *nuc*. Si le spécimen possédait le gène *nuc*, le bouillon d'enrichissement était sous-cultivé sur gélose au sang et gélose Mannitol Salt Agar. Les colonies caractéristiques du *S. aureus* étaient confirmées par PCR avec les amorces *mecA* seulement.

#### – *Comparaison des méthodes PCR*

Pour réaliser la comparaison des méthodes PCR sur le carrousel LC2.0 de Roche Diagnostics et sur le thermocycleur LC480, nous avons repris les échantillons d'ADN extraits par les technologistes au laboratoire de microbiologie clinique du CHUS. Nous avons sélectionné les spécimens regroupés (*pool*) positifs et les négatifs et les spécimens

séparés (*dépoolés*) avec les amorces cliniques nuc (286F/564R) et mecA (1596F/1783R) à une concentration de 0,45µM. Nous avons comparé 447 spécimens regroupés, 401 spécimens séparés (*dépoolés*) et 110 colonies isolées réparti sur 3 mois.

À chaque échantillon, qu'il s'agisse d'un spécimen combiné (pool), dépoolé ou de la colonie isolée, nous avons fait les analyses PCR avec les amorces nuc et mecA.

Par la suite, nous avons élaboré la nouvelle procédure incluant un nouvel horaire journalier pour la logistique au laboratoire clinique. Par la suite, nous avons procédé à l'implantation de la nouvelle procédure au laboratoire de microbiologie clinique.

## Résultats

Nous avons comparé 447 spécimens regroupés « *poolés* » avec les deux appareils, 401 spécimens séparés « *dépoolés* » ont été comparés et 110 colonies isolées des géloses ont été analysées.

Sur les 401 spécimens regroupés « *poolés* » 121 spécimens possédaient le gène *nuc* (*nuc*<sup>+</sup>) et 87 spécimens possédaient les gènes *nuc* et *mecA* (*nuc*<sup>+</sup>, *mecA*<sup>+</sup>)

Sur les 110 colonies isolées, 30 colonies étaient *nuc*<sup>+</sup>, *mecA*<sup>+</sup> (SARM).

Le tableau de contingence suivant présente les résultats obtenus en comparant les colonies isolées en sous-culture (LC 2.0) et le résultat des bouillons séparés « *dépoolés* » analysé par le LC480 avec les amorces *nuc* et *mecA*.

		RÉSULTATS DU LC 2.0 (AMORCES MECA)		
		COLONIES ISOLÉES SARM	COLONIES ISOLÉES SASM	SOUS- CULTURES NÉGATIVES
RÉSULTATS DU LC480 (AMORCES NUC ET MECA)	DÉPOOLS BOUILLONS + (SARM)	30	45	4
	DÉPOOLS BOUILLONS - (SASM)	0	35	7

***Conclusion***

En plus de permettre l'analyse de 45 patients + 3 contrôles, le LC480 de Roche Diagnostics permet d'analyser le gène *nuc* et le gène *mecA* simultanément. Sur les 121/401 bouillons *nuc* +, 42 spécimens n'avaient pas le gène *mecA* donc n'aurait pas étéensemencé.

## **ANNEXE II**

### **FORMULAIRE D'INFORMATION ET DE CONSENTEMENT À LA RECHERCHE (CSSS RY)**



## FORMULAIRE D'INFORMATION ET DE CONSENTEMENT À LA RECHERCHE

**Titre du projet:** Validation du bouillon d'enrichissement pour la croissance simultanée du SARM et de l'ERV

**Chercheur principal:** Pr Eric Frost, Ph.D.

**Numéros du projet :**

Nous sollicitons votre participation à un projet de recherche afin de permettre la validation d'un nouveau test diagnostique au laboratoire de microbiologie clinique.

Cependant, avant d'accepter de participer à ce projet, veuillez prendre le temps de lire, de comprendre et de considérer attentivement les renseignements qui suivent. Si vous acceptez de participer au projet de recherche, vous devrez signer le consentement à la fin du présent document et nous vous en remettrons une copie pour vos dossiers.

Ce formulaire d'information et de consentement vous explique le but de ce projet de recherche, les procédures, les avantages, les risques et les inconvénients, de même que les personnes avec qui communiquer au besoin. Il peut contenir des mots que vous ne comprenez pas. Nous vous invitons à poser toutes les questions nécessaires au chercheur responsable du projet ou aux autres personnes affectées au projet de recherche et à leur demander de vous expliquer tout mot ou renseignement qui n'est pas clair.

### POUR INFORMATION

Si vous avez des questions concernant le projet de recherche, veuillez communiquer, du lundi au vendredi, entre 8 h et 16 h :

Evelyne Benoît, étudiante à la maîtrise

Pr Eric Frost

## NATURE ET OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE

Lors de votre séjour à l'hôpital, il est possible que vous soyez infecté par des bactéries. Ces bactéries peuvent vous rendre malade ou être un colonisant (porteur sans symptôme d'une bactérie) mais éventuellement vous rendre malade ou elles peuvent se transférer à une autre personne. Cette étude s'intéresse à deux microorganismes qui sont souvent transmis à l'hôpital : le *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM) et l'Entérocoques résistants à la vancomycine (ERV). Ce sont deux bactéries multirésistantes aux antibiotiques. Il est possible d'être porteur de(s) la(les) bactérie(s) sans qu'elles vous rendent malade.

En général, les personnes en bonne santé risquent peu d'être malades à cause de ces bactéries. Cependant, les personnes ayant un système immunitaire plus faible ou souffrant de certaines maladies (personnes âgées, personnes hospitalisées, etc.) peuvent souffrir d'infections sévères. Il est donc important, à l'hôpital, de détecter la présence de ces bactéries afin de limiter la propagation.

Cette étude est réalisée dans le but d'optimiser la détection du SARM et de l'ERV par méthodes biomoléculaires et en introduisant un nouveau milieu de culture permettant la croissance de ces deux bactéries. Puisque ces milieux de culture qui permettent la multiplication spécifique des bactéries SARM et ERV sont sous forme liquide, nous les appelons des bouillons d'enrichissement dans le jargon du laboratoire d'où le titre du projet.

Le but de l'étude est de comparer la croissance des bactéries en utilisant les milieux de culture actuellement employés au laboratoire de microbiologie clinique du CHUS avec le nouveau milieu de croissance qui permettra la croissance simultanée des deux bactéries étudiées.

## DÉROULEMENT DU PROJET DE RECHERCHE

Une seule visite d'environ 30 minutes sera nécessaire pour la réalisation de ce projet. Elle consiste à obtenir votre consentement pour participer à cette étude, et si vous consentez, la prise de l'échantillon nasal et rectal (prélèvement recueilli grâce à un écouvillon (tige montée de genre « Q-tips »)). Les écouvillons seront acheminés au laboratoire de recherche pour les analyses. En signant ce formulaire, vous permettrez à l'équipe de recherche de comparer vos résultats antérieurs avec vos nouveaux résultats. Seuls les résultats de dépistages du SARM et de l'ERV seront consultés.

Pendant que vous ferez partie de cette étude, vous continuerez de recevoir les traitements habituels prescrits par vos médecins traitants. Aucun médicament ne sera donné par l'équipe de recherche et aucun changement ne sera apporté dans la façon dont les médecins s'occuperont de vous.



À la fin de l'étude, ces échantillons pourront être utilisés pour développer et évaluer des tests de détection pour le SARM et l'ERV. Ces échantillons ne seront pas utilisés pour des analyses génétiques. Les échantillons seront conservés au laboratoire de recherche dans un congélateur verrouillé pour une période de cinq ans, date à laquelle les restes des échantillons seront détruits. Une fois que l'analyse de vos échantillons sera exécutée, l'équipe de recherche comparera ces résultats aux résultats déjà obtenus par le laboratoire de microbiologie clinique du CHUS/CSSS Richelieu-Yamaska qui ont été effectués lors de votre admission à l'hôpital.

## **RISQUES ET INCONVÉNIENTS**

Votre participation à cette recherche ne vous fait courir aucun risque sur le plan médical. Dans le cadre de cette étude, aucun médicament ne vous sera administré par l'équipe de recherche. Le prélèvement nasal ou rectal peut occasionner un inconfort temporaire. L'écouvillon nasal peut aussi causer un léger saignement nasal, un léger inconfort ou un écoulement nasal.

## **AVANTAGES**

Vous ne retirerez aucun bénéfice personnel de votre participation à ce projet de recherche. Toutefois, les résultats obtenus permettront d'accroître la rapidité d'exécution des analyses en laboratoire. Le temps d'isolement des patients en attente d'un résultat sera réduit significativement. Les informations recueillies permettront d'aider à développer de meilleurs tests diagnostiques. Nous espérons qu'ils limiteront encore plus la transmission de ces bactéries entre les patients hospitalisés.

## **PARTICIPATION VOLONTAIRE ET POSSIBILITÉ DE RETRAIT DU PROJET DE RECHERCHE**

Votre participation à ce projet de recherche est volontaire. Vous êtes donc libre de refuser d'y participer. Vous pouvez également vous retirer de ce projet à n'importe quel moment, sans avoir à donner de raison, en faisant connaître votre décision au chercheur responsable du projet ou à l'un de ses assistants.

Votre décision de ne pas participer à ce projet de recherche ou de vous en retirer n'aura aucune conséquence sur la qualité des soins et des services auxquels vous avez droit ou sur vos relations avec votre médecin ou avec le chercheur responsable du projet et les autres intervenants.

Si vous vous retirez de l'étude ou en êtes retiré, l'information médicale déjà obtenue dans le cadre de l'étude sera conservée aussi longtemps que nécessaire pour assurer la sécurité des participants et rencontrer les exigences réglementaires. Si vous désirez que vos échantillons prélevés soient détruits, veuillez en aviser les membres de l'équipe de recherche.

Toute nouvelle connaissance acquise durant le déroulement de l'étude qui pourrait affecter votre décision de continuer d'y participer vous sera communiquée sans délai.

## CONFIDENTIALITÉ

Durant votre participation à ce projet, le chercheur responsable du projet ainsi que son personnel recueilleront et consigneront dans un dossier de recherche les renseignements vous concernant. Seuls les renseignements nécessaires pour répondre aux objectifs scientifiques de l'étude seront recueillis.

Tous ces renseignements recueillis au cours du projet demeureront strictement confidentiels dans les limites prévues par la loi. Afin de préserver votre identité et la confidentialité de ces renseignements, vous ne serez identifié que par un numéro de code. La clé du code reliant votre nom à votre dossier de recherche sera conservée par le chercheur responsable du projet de manière sécuritaire.

Aucun échantillon ne sera envoyé à l'extérieur du CHUS. Les échantillons porteront un numéro de code et aucune donnée permettant de vous identifier sera inscrite sur le prélèvement. Quelques informations personnelles telles que votre âge, sexe, sévérité de la maladie et votre état de santé à votre congé seront inscrits à votre dossier de recherche, mais aucune information permettant de vous identifier ne sera utilisée.

Le chercheur responsable du projet utilisera les données à des fins de recherche dans le but de répondre aux objectifs scientifiques du projet décrits dans ce formulaire d'information et de consentement.

Les données pourront être publiées dans des revues médicales ou partagées avec d'autres personnes lors de discussions scientifiques. Aucune publication ou communication scientifique ne renfermera quoi que ce soit qui peut permettre de vous identifier.

À des fins de surveillance et de contrôle, votre dossier de recherche ainsi que vos dossiers médicaux pourront être consultés par une personne mandatée par le CÉR en santé chez l'humain du CHUS, par le CÉR du CSSS-IUGS, CSSS-RY ou encore par une personne mandatée par des organismes publics autorisés. Toutes ces personnes et ces organismes adhèrent à une politique de confidentialité.

À des fins de protection, notamment afin de pouvoir communiquer avec vous rapidement vos noms et prénoms, vos coordonnées et la date de début et de fin de votre participation au projet seront conservés pendant un an après la fin du projet dans un répertoire sécurisé maintenu par le chercheur.

Vous avez le droit de consulter votre dossier de recherche pour vérifier les renseignements recueillis et les faire rectifier au besoin, et ce, aussi longtemps que le chercheur responsable du

projet ou le CHUS détiennent ces informations. Cependant, afin de préserver l'intégrité scientifique de l'étude, vous pourriez n'avoir accès à certaines de ces informations qu'une fois l'étude terminée.

## **COMPENSATION**

Vous ne recevrez aucune compensation pour votre participation à ce projet de recherche.

## **DROITS DU PARTICIPANT ET INDEMNISATION EN CAS DE PRÉJUDICE**

Si vous deviez subir quelque préjudice que ce soit dû à votre participation au projet de recherche, vous êtes protégé par les lois en vigueur au Québec. En acceptant de participer à cette étude, vous ne renoncez à aucun de vos droits, ni ne libérez les chercheurs ou l'établissement où se déroule ce projet de recherche de leurs responsabilités civile et professionnelle.

## **PERSONNES-RESSOURCES**

Si vous avez des questions concernant le projet de recherche, vous pouvez communiquer avec l'une des personnes suivantes :

Pr Eric Frost :

Evelyne Benoît :

Pour toute question concernant vos droits en tant que personne participant à ce projet de recherche ou si vous avez des plaintes ou des commentaires à formuler vous pouvez communiquer le/la commissaire local(e) aux plaintes et à la qualité des services :

Pour le CHUS :

Pour le CSSS-IUGS :

Pour l'Hôpital Honoré-Mercier :

## **SURVEILLANCE DES ASPECTS ÉTHIQUES**

Les CÉR du CHUS, du CSSS-IUGS et du CSSS-Richelieu-Yamaska ont approuvé ce projet de recherche et en assurent le suivi.

Nous nous engageons à leur soumettre pour approbation toute révision et toute modification apportée au protocole de recherche ou au formulaire d'information et de consentement.

Si vous désirez rejoindre l'un des membres de ces comités, vous pouvez communiquer avec le Service de soutien à l'éthique de la recherche

Pour le CHUS :

Pour le CSSS-IUGS :

Pour l'Hôpital Honoré-Mercier :

## **CONSENTEMENT**

Je déclare avoir lu le présent formulaire d'information et de consentement, particulièrement quant à la nature de ma participation au projet de recherche et l'étendue des risques qui en découlent. Je reconnais qu'on m'a expliqué le projet, qu'on a répondu à toutes mes questions et qu'on m'a laissé le temps voulu pour prendre une décision.

Je suis d'accord à ce que mes échantillons soient conservés pour 5 ans pour des recherches futures portant sur la détection du SARM et de l'ERV. Aucun test génétique (caractères héréditaires) ne sera effectué sur ces échantillons.

Je comprends que je peux refuser à tout moment de participer et que ceci n'affectera aucunement mes soins.

Je consens librement et volontairement à participer à ce projet.

---

<b>Nom du/de la participant(e)</b>	<b>Signature du/de la participant(e)</b>	<b>Date</b>
------------------------------------	--	-------------

(Lettres moulées)

### **ENGAGEMENT DE LA PERSONNE QUI OBTIENT LE CONSENTEMENT**

Je déclare avoir expliqué au participant les termes du présent formulaire d'information et de consentement et avoir répondu au meilleur de mes connaissances aux questions qu'il m'a posées.

---

Nom et signature de la personne qui obtient le consentement	Date
---	------

### **ENGAGEMENT DU CHERCHEUR PRINCIPAL**

Je m'engage, avec mon équipe de recherche, à respecter ce qui a été convenu au présent formulaire d'information et de consentement et à ce qu'une copie signée soit remise au participant.

Je m'engage également à respecter le droit de retrait du participant et à l'informer de toute nouvelle connaissance acquise durant le déroulement du projet qui pourrait modifier sa décision de continuer d'y participer.

---

<b>Pr Eric Frost, Ph.D.</b>	<b>Signature du chercheur</b>	<b>Date</b>
-----------------------------	-------------------------------	-------------

### **ANNEXE III**

#### **CERTIFICATS D'APPROBATION FINALE CÉR**



### Envoi courriel

Le 25 juillet 2013

Docteur Eric Frost  
 Département de microbiologie et d'infectiologie  
 Faculté de médecine et des sciences de la santé  
 Université de Sherbrooke  
 Sherbrooke (Québec) J1K 2R1  
 Courriel :

<b>Objet :</b>	<b>Approbation finale</b>
<b>Projet :</b>	<b>Validation du bouillon d'enrichissement pour la croissance du SARM (<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline) et de l'ERV (Entérocoque résistant à la vancomycine).</b>
	<div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 15px; margin-bottom: 5px;"></div> Chercheur principal : Eric Frost Co-chercheur : Evelyne Benoît

Docteur,

Le comité d'éthique de la recherche du CSSS Richelieu-Yamaska, a fait l'examen de la demande précitée, en processus accéléré, en comité restreint, le 25 juillet 2013. À cette fin, les documents suivants ont été examinés :

- Le Curriculum vitae du chercheur principal;
- Le protocole du projet de recherche;
- Le formulaire de consentement modifié suite aux commentaires faits;
- Le résumé du projet de recherche.

À la lecture de tous les documents reçus, le tout est jugé satisfaisant. Je vous retourne par courriel une copie du formulaire de consentement portant l'estampille d'approbation du comité. Veuillez noter que nous avons déplacé un des logos à la première page pour qu'il soit visible dans sa totalité. De plus, nous avons apporté une correction mineure à l'adresse électronique de Mme Yolaine Rioux à la page 5. Seul ce formulaire devra être utilisé pour signature par les sujets.

... / 2

Comité d'éthique de la recherche  
 2750, boulevard Laframboise  
 Saint-Hyacinthe (Québec) J2S 4Y8

La présente constitue l'approbation finale, valide pour un an à compter du 25 juillet 2013, date de l'approbation initiale. Je vous rappelle que toute modification au protocole et/ou au formulaire de consentement en cours d'étude, doit être soumise pour approbation du comité d'éthique.

Cette approbation suppose que vous vous engagez :

1. à respecter la présente décision;
2. à respecter les moyens de suivi continu (cf Statuts et Règlements)
3. à conserver les dossiers de recherche pendant la période requise par les textes réglementaires, suivant la fin du projet, afin de permettre leur éventuelle vérification par une instance déléguée par le comité;
4. à respecter les modalités arrêtées au regard du mécanisme d'identification des sujets de recherche dans l'établissement.

Enfin, l'étude de la convenance du projet à notre établissement est terminée et le projet a été jugé satisfaisant. Celui-ci pourra donc commencer dans nos murs.

Vous souhaitant la meilleure des chances dans la poursuite de vos travaux, je vous prie d'accepter, Madame, mes salutations distinguées.

La présidente du comité d'éthique de la recherche

Catherine Rodrigue, conseillère en éthique  
Présidente  
Comité d'éthique de la recherche du CSSS Richelieu-Yamaska  
CR/mjb

Coordonnées de la personne-ressource (volet administratif) pour ce projet :

- Mme Yolaine Rioux



**PAR COURRIEL SEULEMENT**

Sherbrooke, le 5 novembre 2013

Professeur Éric Frost  
Centre de recherche sur le vieillissement  
CSSS-IUGS  
1036, rue Belvédère Sud  
Sherbrooke (Québec) J1H 4C4

**Objet :**     **Approbation finale du projet de recherche**  
Validation du bouillon d'enrichissement pour la croissance du SARM (Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline) et de l'ERV (Entérocoque résistant à la vancomycine)

---

Professeur Frost,

Le Comité d'éthique de la recherche du CSSS-IUGS a évalué, en comité restreint, le projet de recherche cité en rubrique au vu du document suivant, envoyé par courriel le 4 novembre 2013 :

- Formulaire d'information et de consentement à la recherche CSSS-IUGS

Suite à l'évaluation de l'ensemble du dossier, j'ai le plaisir de vous informer que votre projet de recherche a été approuvé.

La présente approbation éthique est valide pour un an à compter du 5 novembre 2013, date de l'approbation finale. Un mois avant la date d'échéance, vous devrez faire une demande de renouvellement auprès du comité d'éthique de la recherche du CSSS-IUGS en utilisant le document du comité prévu à cet effet. Les formulaires pourront être complétés à partir du logiciel Nagano, que vous retrouverez sous l'onglet « Recherche » de la page web du CSSS-IUGS.

En acceptant le certificat d'éthique joint en annexe, vous vous engagez à :

- Soumettre, pour approbation préalable au comité, toute demande de modification au projet de recherche ou à tout document approuvé par le comité pour la réalisation de votre projet.
- Soumettre, dès que cela est porté à votre connaissance et s'il y a lieu :
  - les réactions indésirables graves, les réactions indésirables et inattendues et les accidents observés en cours de recherche, et ce, dans les six jours ouvrables qui suivent;
  - tout nouveau renseignement sur des éléments susceptibles d'affecter l'intégrité ou l'éthicité du projet de recherche ou d'accroître les risques et les inconvénients des sujets, de nuire au bon déroulement du projet ou d'avoir une incidence sur le désir d'un sujet de recherche de continuer sa participation au projet de recherche;



- toute modification constatée au chapitre de l'équilibre clinique à la lumière des données recueillies;
- la cessation prématurée du projet de recherche, qu'elle soit temporaire ou permanente;
- tout problème identifié par un tiers, lors d'une enquête, d'une surveillance ou d'une vérification interne ou externe;
- toute suspension ou annulation de l'approbation octroyée par un organisme de subvention ou de réglementation;
- toute procédure en cours de traitement d'une plainte ou d'une allégation de manquement à l'intégrité ou à l'éthique ainsi que des résultats de la procédure.

La présente décision peut être suspendue ou révoquée en cas de non-respect de ces exigences. En plus du suivi administratif d'usage, le CÉR pourra effectuer un suivi actif au besoin selon les modalités qu'il juge appropriées.

En terminant, nous vous rappelons que vous devez conserver pour une période d'au moins un an suivant la fin du projet, un répertoire distinct comprenant les noms, prénoms, coordonnées, date du début et de fin de la participation de chaque sujet de recherche.

Le Comité d'éthique de la recherche du CSSS-IUGS est institué par le ministre de la Santé et des Services sociaux aux fins de l'application de l'article 21 du Code civil du Québec et respecte les règles émises par l'Énoncé de politique des trois conseils et les Bonnes pratiques cliniques de la CIH.

Je vous prie d'accepter, Professeur Frost, mes meilleures salutations.

Chantal Doré, Ph. D.  
Présidente

CD/lv

p. j. Certificat éthique

Sherbrooke, le 5 novembre 2013

## CERTIFICAT D'ÉTHIQUE EN MATIÈRE DE RECHERCHE SUR DES HUMAINS

Le Comité d'éthique de la recherche du Centre de santé et de services sociaux - Institut universitaire de gériatrie de Sherbrooke atteste qu'il a dûment évalué et approuvé les documents qui lui ont été soumis.

### TITRE DU PROJET DE RECHERCHE

*Validation du bouillon d'enrichissement pour la croissance du SARM (Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline) et de l'ERV (Entérocoque résistant à la vancomycine)*

LA PRESENTE APPROBATION A ETE DEMANDEE PAR :

Professeur Éric Frost  
 Chercheur principal  
 Centre de recherche sur le vieillissement  
 CSSS-IUGS

✚ L'approbation éthique pour ledit projet de recherche est valide jusqu'au **5 novembre 2014**

Le numéro de dossier attribué au projet cité en rubrique par le CÉR est le :

Chantal Doré, Ph.D.  
 Présidente

CD/lv

c. c. Madame Janie Paquet, agente de la gestion financière, Centre de recherche sur le vieillissement, CSSS-IUGS